

**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

**(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional**



PCT

**(43) Fecha de publicación internacional
14 de Octubre de 2004 (14.10.2004)**

**(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/087900 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 7/04,
15/866, A61K 39/12

E-28006 Madrid (ES). **RUIZ CASTÓN, José** [ES/ES]; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **RODRIGUEZ FERNANDEZ-ALBA, Juan, Ramón** [ES/ES]; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2004/000147

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Orense, 16, E-28020 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación Internacional:
31 de Marzo de 2004 (31.03.2004)

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 2003 00751 31 de Marzo de 2003 (31.03.2003) ES

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). BIONOSTRA, S.L. [ES/ES]; Ronda de Poniente, 4, E-28760 Tres Cantos (ES).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: COMPLETE EMPTY VIRAL PARTICLES OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS (IBDV), PRODUCTION METHOD THEREOF AND APPLICATIONS OF SAME

(54) Título: PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS COMPLETAS DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), PROCEDIMIENTO PARA SU PRODUCCIÓN Y APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to complete empty viral particles of infectious bursal disease virus (IBDV), which contain all of the antigenically-relevant proteinaceous constituents present in determinant IBDV virions and which can be obtained by means of genetic engineering in suitable expression systems. The aforementioned capsids can be used in the production of vaccines against avian disease, which is known as infectious bursitis and which is caused by IBDV, and in the development of gene therapy vectors.

WO 2004/087900 A1

(57) Resumen: Las partículas virales vacías completas del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) contienen todos los componentes proteicos antigenicamente relevantes presentes en los viriones de IBDV determinantes y pueden ser obtenidas en mediante ingeniería genética en sistemas de expresión apropiados. Dichas cápsidas son útiles en la producción de vacunas frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa causada por IBDV y en la elaboración de vectores para terapia génica.

PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS COMPLETAS DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), PROCEDIMIENTO PARA SU PRODUCCIÓN Y APLICACIONES

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se relaciona con partículas virales vacías completas del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV), con actividad inmunogénica frente a IBDV, su producción mediante ingeniería genética y sus aplicaciones, en particular, en la producción de vacunas para sanidad animal, por ejemplo, en la elaboración de vacunas frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa causada por IBDV y en la elaboración de vectores para terapia génica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Durante las últimas cuatro décadas del siglo XX se produjo la aparición y dispersión global de una enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa (IBD). La IBD se caracteriza por la destrucción de las poblaciones de linfocitos pre-B que residen en la bolsa de Fabricio de los animales infectados (Sharma JM et al. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol.* 24:223-35). Esta enfermedad está causada por el virus de la bursitis infecciosa (IBDV) perteneciente a la familia *Birnaviridae* (Leong JC et al. 2000. *Virus Taxonomy Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA). A pesar de la implementación de programas de vacunación intensivos, basados en el uso de combinaciones de vacunas vivas e inactivadas, se siguen reportando brotes de IBD en todos los países productores de carne de pollo (van den Berg TP et al. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech.* 19:509-43).

Los viriones del virus de la bursitis infecciosa carecen de envuelta lipídica, presentan una estructura icosaédrica (simetría T=13) y tienen un diámetro de 65-70 nm (Bottcher B. et al. 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol.* 71:325-30; Castón JR et al. 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *J Virol.* 75:10815-28). La cápsida está formada por una única capa proteica que contiene cuatro polipéptidos diferentes denominados VPX, VP2, VP3 y VP1, respectivamente. Las proteínas VPX, VP2 y VP3 se producen mediante procesamiento

proteolítico de un recursor, denominado poliproteína viral, codificado por el segmento genómico A. La proteína VP1 se produce mediante expresión del gen correspondiente codificado por el segmento B.

La poliproteína viral, sintetizada como un precursor de 109 kDa, es procesada de forma cotraduccional dando lugar a la formación de tres polipéptidos denominados VPX, VP3 y VP4. VP4 es responsable de este procesamiento (Birghan C. et al. 2000. A non-canonical ion proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo J.* 19:114-23). VP3 es un polipéptido de 29 kDa que forma subunidades triméricas que tapizan la capa interna de la cápsida. VPX (también conocida como pVP2) sufre un segundo procesamiento proteolítico que da lugar a la forma madura de la proteína denominada VP2. La superficie externa de los viriones está formada por subunidades triméricas constituidas por una relación variable de VPX y VP2 (Chevalier C et al. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J Virol.* 76:2384-92; Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol.* 73:6973-83). Se ha sugerido que la conversión de VPX a VP2 está asociada con la formación de cápsidas maduras (Chevalier C et al. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J Virol.* 76:2384-92; Martínez-Torrecuadrada JL. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology.* 278:322-31). Los sitios de procesamiento proteolítico de la poliproteína han sido caracterizados (Da Costa B et al. 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol.* 76:2393-402; Sánchez AB & Rodríguez JF. 1999. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology.* 262:190-9), lo que permite una expresión fidedigna de los polipéptidos de la cápsida. La ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) viral, denominada VP1, interacciona con la proteína VP3 dando lugar a un complejo que facilita su encapsidación (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol.* 73:6973-83; Tacken M et al. 2000. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-

dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol.* 81 Pt 1:209-18). El dominio de la proteína VP3 responsable de esta interacción está localizado en sus 16 residuos C-terminales (Maraver A et al. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of the inner capsid protein VP3 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 77:2459-2468). La proteína VP3 interacciona con ARN de forma inespecífica. Esta interacción no requiere la existencia de secuencias específicas en la molécula de ARN (Kochan G et al. 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Archives of Virology* 148:723-744). Parece probable, al igual que lo observado con otras proteínas internas de cápsidas de otros virus, que VP3 estabilice el ARN genómico en la partícula viral.

Las vacunas convencionales empleadas para el control de la bursitis infecciosa se basan en el empleo de cepas, con diferentes grados de virulencia, del propio IBDV crecidas en cultivo celular o en huevos embrionados. Los extractos que contienen el material infeccioso son sometidos a procesos de inactivación química para producir vacunas 15 inactivadas o bien son empleados de forma directa para producir vacunas vivas atenuadas (Sharma JM et al. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology* 24:223-235; van den Berg TP et al. 2000. *Rev Sci Tech* 2000, 19:509-543). Este último tipo de vacunas presenta los inconvenientes clásicos asociados con el empleo de vacunas vivas atenuadas, 20 concretamente, el riesgo de mutaciones que reviertan la virulencia del virus o le hagan perder su inmunogenicidad.

Se han descrito vacunas sub-unidad recombinantes que contienen la proteína VP2 de IBDV expresada en diversos sistemas de expresión, por ejemplo, bacterias, levaduras o baculovirus, normalmente en forma de proteína de fusión. Los resultados obtenidos en 25 ensayos de inmunización de pollos con dichas vacunas no han sido completamente satisfactorios.

Las cápsidas virales vacías o partículas pseudovirales (VLPs, del inglés “virus-like particles”), constituyen una alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas y de vacunas sub-unidad recombinantes. Las VLPs se obtienen por autoensamblaje de las sub-unidades 30 constituyentes de la cápsida viral y mimetizan la estructura y propiedades antigenicas del virión nativo aunque carecen de material genético por lo que son incapaces de replicarse. Además de su aplicación con fines vacunales las VLPs pueden ser utilizadas como vectores de moléculas de interés biológico, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos o proteínas. A

modo ilustrativo pueden citarse VLPs de parvovirus (US 6.458.362) o del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (US 6.602.705).

La morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

Se ha descrito la producción de distintas VLPs de IBDV mediante expresión de la poliproteína viral empleando distintos sistemas de expresión. En 1997, Vakharia describió por primera vez la obtención de VLPs de IBDV en células de insecto (Vakharia, V. N. 1997. Development of recombinant vaccines against infectious bursal disease. *Biotechnology Annual Review* 3:151-68). Posteriormente, en 1998, el grupo de investigación al que pertenecen los inventores demostró la posibilidad de obtener VLPs de IBDV en células de mamífero (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 79:1047-54). En 1999 se publicó un artículo describiendo la obtención de VLPs de IBDV en células de insecto por parte de otro grupo de investigación (Kibenge FS et al. 1999. Formation of virus-like particles when the polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells. *Can J Vet Res* 63:49-55). Un estudio posterior, publicado por el laboratorio al que pertenecen los inventores, en colaboración con INGENASA S.A., demostró que la morfogénesis de VLPs de IBDV en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresan la poliproteína de IBDV es muy ineficiente y conduce a la acumulación mayoritaria de estructuras tubulares aberrantes (Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278:322-331). Estos resultados fueron posteriormente corroborados por otro grupo de investigación (Chevalier C et al. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* 76:2384-92). En ese mismo artículo, ese grupo de investigadores demostró la posibilidad de obtener una morfogénesis eficiente mediante la expresión de una poliproteína químérica formada por la fusión de la fase de lectura abierta (ORF) correspondiente a la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo 3' de la fase de lectura

abierta de la poliproteína de IBDV. La expresión de esta poliproteína quimérica conduce a la formación de VLPs recombinantes de IBDV que contienen en su interior una proteína de fusión VP3-GFP recombinante, diferente a la presente en los viriones de IBDV. Por otra parte, los resultados descritos en este último trabajo no aportan información acerca del 5 mecanismo responsable de la ineficacia del proceso morfogenético de las VLPs de IBDV en células de insecto.

Es importante resaltar que todas las VLPs descritas con anterioridad carecen de la proteína VP1, la cual se encuentra presente en los viriones de IBDV. La única referencia a la obtención de VLPs de IBDV que incluyen la VP1 ha sido realizada por investigadores del 10 laboratorio al que pertenecen los inventores (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83) empleando como vector el virus vacunal, lo que impide la posible utilización de dichas VLPs con fines vacunales.

15 Los diversos procedimientos de producción de VLPs de IBDV descritos previamente adolecen de diferentes defectos que reducen o impiden su aplicabilidad para la generación de vacunas frente a IBDV ya que:

- i) la producción de VLPs de IBDV en células de mamífero se basa en el empleo de recombinantes del virus vacunal; sin embargo, ese sistema de producción tiene un costo muy elevado y, al emplear un virus recombinante capaz de infectar tanto mamíferos como aves, no reúne las condiciones de bioseguridad necesarias para su empleo como vacuna;
- 20 ii) la producción de VLPs de IBDV en células de insecto empleando sistemas de expresión convencionales, es decir baculovirus recombinantes que expresan únicamente la poliproteína viral, es muy ineficiente conduciendo a una producción de VLPs prácticamente nula;
- 25 iii) la producción de VLPs de IBDV en células de insecto mediante la expresión de una poliproteína quimérica (formada por la fusión de la ORF correspondiente a la GFP al extremo 3' de la ORF correspondiente a la poliproteína de IBDV) tiene como resultado la producción de VLPs de IBDV que contienen una proteína de fusión VP3-GFP, lo que introduce un elemento proteico no presente en viriones de IBDV, de efecto desconocido y de dudosa aplicabilidad en la 30 cadena de producción de carne de pollo para consumo humano, y

iv) ninguno de los sistemas descritos con anterioridad para la producción de VLPs de IBDV basados en el empleo de baculovirus recombinantes permite la obtención de VLPs de IBDV que contengan todos los antígenos presentes en los viriones de IBDV.

5

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención se enfrenta, en general, con el problema de proporcionar nuevas vacunas eficaces y seguras frente al virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV).

La solución proporcionada por esta invención se basa en que es posible obtener VLPs de IBDV correctamente ensambladas mediante la expresión simultánea de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV a partir de dos fases de lectura abiertas (ORFs) independientes en células hospedadoras apropiadas. En una realización particular, la expresión de dichas ORFs está controlada por promotores diferentes. Dichas VLPs de IBDV están formadas por autoensamblaje de las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1 de IBDV, por lo que contienen todos elementos proteicos antigenicamente relevantes presentes en los viriones purificados e infectivos de IBDV, y, por ese motivo, se denominan "VLPs completas de IBDV" en esta descripción. Dado que dichas VLPs completas de IBDV contienen todos los elementos proteicos antigenicamente relevantes presentes en los viriones purificados e infectivos de IBDV para inducir una respuesta inmune o antigenica, dichas VLPs completas de IBDV pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, por ejemplo, en la elaboración de vacunas, tales como vacunas para proteger aves de la infección causada por IBDV o en la elaboración de vectores para terapia génica; con fines de diagnóstico, etc.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que: (i) la proteína VP3 de IBDV, expresada en células de insecto a partir de la expresión de la poliproteína viral, sufre un procesamiento proteolítico que elimina los últimos 13 restos de aminoácidos de su extremo C-terminal; (ii) la proteína VP3 resultante (denominada VP3T) es incapaz de formar oligómeros, lo que produce un bloqueo prácticamente total del proceso morfogenético que induce una producción prácticamente nula de VLPs; y (iii) la asociación de la proteína VP3 con la proteína VP1 protege a la primera (VP3) frente al procesamiento proteolítico.

Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia o procedimiento para la producción eficiente de VLPs completas de IBDV y que, a diferencia de los métodos descritos previamente, presentan una morfogénesis eficaz a la vez que se evita la presencia en éstas de elementos proteicos heterólogos inexistentes en partículas virales purificadas.

Esta estrategia se basa en la utilización de un sistema o vector de expresión génica que permite la co-expresión de la poliproteína viral y de la proteína VP1 como ORFs independientes, lo que garantiza la presencia de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV durante el proceso de ensamblaje de las VLPs completas de IBDV. En esas 5 condiciones, las proteínas VP3 y VP1 forman complejos estables que impiden la degradación proteolítica de VP3, asegurando su correcto funcionamiento, y conducen a la incorporación de VP1 en las VLPs de IBDV.

En una realización particular, dicho sistema de expresión génica se basa en el empleo de un baculovirus recombinante dual que expresa simultáneamente la poliproteína viral y la 10 proteína VP1 de IBDV a partir de dos ORFs independientes controladas por promotores diferentes. En otra realización particular, dichas VLPs completas de IBDV se obtienen como resultado de la co-infección de células hospedadoras, tales como células de insecto, con dos baculovirus recombinantes, uno de ellos capaz de expresar la poliproteína viral y el otro la proteína VP1 de IBDV.

15 Las vacunas obtenidas utilizando dichas VLPs completas de IBDV presentan numerosas ventajas ya que se evita la manipulación de material altamente infeccioso, se previene el riesgo potencial de aparición de nuevos mutantes de IBDV y se elimina el uso de virus vivo en las explotaciones avícolas, previniéndose de este modo el riesgo de diseminación de cepas vacunales de IBDV al Medio Ambiente.

20 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se relaciona con una VLP completa de IBDV compuesta por ensamblaje de las proteínas PVX, VP2, VP3 y VP1 de IBDV. Dicha VLP completa de IBDV presenta actividad antigénica o inmunogénica frente a la infección causada por IBDV.

25 Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas VLPs completas de IBDV proporcionadas por esta invención, basado en la co-expresión génica de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV como dos ORFs independientes en células hospedadoras apropiadas. En una realización particular, la expresión de dichas ORFs está controlada por promotores diferentes.

30 Las construcciones génicas, los sistemas de expresión y las células hospedadoras desarrolladas para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de dichas VLPs completas de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas VLPs completas de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Dichas VLPs completas de IBDV tienen la capacidad de inmunizar animales, en particular, aves, frente a la enfermedad aviar causada por el IBDV así como la capacidad de vectorizar o vehiculizar moléculas de interés biológico, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En una realización particular, dichas VLPs completas de IBDV pueden 5 ser utilizadas en la elaboración de vacunas para proteger aves frente al virus inductor de la enfermedad aviar conocida como bursitis infecciosa (IBDV). Prácticamente cualquier ave, preferentemente aquellas especies aviares de interés económico, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices, avestruces, etc., pueden ser inmunizadas frente a la 10 infección causada por IBDV con las vacunas proporcionadas por esta invención. En otra realización particular, dichas VLPs completas de IBDV pueden vehiculizar, en su interior, productos con actividad biológica, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de vectores para terapia 15 genética.

Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el empleo 20 de dichas VLPs completas de IBDV en la elaboración de medicamentos, tales como vacunas y vectores para terapia genética. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención. En una realización particular, dicha vacuna es una vacuna útil para proteger aves de la infección causada por IBDV. En una realización concreta, dichas aves seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y 25 avestruces, preferentemente, pollos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción 30 de baculovirus recombinantes útiles para la producción de VLPs completas de IBDV. En una realización particular, los baculovirus recombinantes obtenidos son duales, es decir, un mismo baculovirus recombinante es capaz de expresar en células hospedadoras apropiadas la poliproteína viral y la proteína VP1 de IBDV a partir de dos ORFs independientes y controladas por promotores de baculovirus diferentes. En otra realización particular, se obtienen unos baculovirus recombinantes capaces de expresar en células hospedadoras apropiadas la poliproteína viral a partir de una secuencia de ácido nucleico que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV bajo el control de un promotor y unos baculovirus recombinantes capaces de expresar en células hospedadoras apropiadas la 35 proteína VP1 de IBDV a partir de una secuencia de ácido nucleico que comprende la ORF correspondiente a la VP1 de IBDV bajo el control de un promotor, igual o diferente al que regula la expresión de la poliproteína viral en dichos baculovirus recombinantes capaces de

expresar la poliproteína viral. Los baculovirus recombinantes resultantes constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Dichos rBVs pueden ser utilizados para la producción de VLPs completas de IBDV.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el efecto de la delección C-terminal de la VP3 de IBDV en la morfogénesis de VLPs. La Figura 1A es un diagrama que representa de forma gráfica los genes derivados de IBDV expresados por los diferentes recombinantes del virus vacunal [VT7/Poly (Poly), descrito por Fernández-Arias et al. (Fernández-Arias A et al. 1998.

10 Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. J. Gen. Virol. 79:1047-1054), VT7/PolyΔ907-1012 (PolyΔ907-1012) y VT7/VP3 (VP3)] empleados para comprobar el efecto de la delección del extremo C-terminal de VP3 en la formación de VLPs de IBDV en células de mamífero. VT7/Poly (Poly) expresa la poliproteína completa. VT7/PolyΔ907-1012 (PolyΔ907-1012) expresa una forma 15 delecionada de la poliproteína que carece de los 150 residuos C-terminales. VT7/VP3 (VP3) expresa la proteína VP3 completa. La Figura 1B ilustra el efecto de la delección del extremo C-terminal de la poliproteína de IBDV sobre la distribución subcelular de las proteínas VPX (pVP2) y VP2, y recoge las imágenes digitales de microscopía confocal obtenidas a partir de células infectadas con los recombinantes VT7/Poly (Poly), VT7/PolyΔ907-1012 (PolyΔ907- 20 1012) y VT7/VP3 (VP3), respectivamente. Las células fueron fijadas a las 24 horas post-infección (h.p.i.) e incubadas con suero de conejo anti-VPX/2 (anti-pVP2/VP2) de IBDV y con suero de rata anti-VP3 de IBDV seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo acoplada a Alexa 488 (verde) y con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de rata acoplada a Alexa 488 (rojo). La Figura 1C muestra el efecto de la delección del 25 extremo C-terminal de la poliproteína de IBDV sobre el ensamblaje de las cápsidas; extractos de células infectadas con VT7/Poly (Poly), VT7/PolyΔ907-1012 (PolyΔ907-1012) o coinfectadas con VT7/PolyΔ907-1012 (PolyΔ907-1012) y VT7/VP3 (VP3) fueron sometidas a fraccionamiento en gradiente de sacarosa. Una alícuota de cada una de las 30 fracciones fue colocada sobre una rejilla de microscopio electrónico, tefñida negativamente y visualizada mediante microscopía electrónica. Las imágenes representan los ensamblados detectados en fracciones equivalentes de los diferentes gradientes.

La Figura 2 muestra los resultados de un análisis comparativo mediante Western blot de la proteína VP3 de IBDV expresada en diferentes sistemas de expresión; extractos de

células infectadas con IBDV, VT7/Poly y FB/Poly, respectivamente, fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3 de IBDV, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa (HRPO: horse radish peroxidase). La señal 5 fue detectada mediante ECL (Enhanced ChimioLuminiscence). Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular.

La Figura 3 muestra la caracterización de la proteólisis C-terminal de la proteína VP3 de IBDV expresada en células de insecto. La Figura 1A es un diagrama que representa de forma gráfica el gen his-VP3 que contiene una cola de histidinas fusionado al extremo N-terminal de VP3 expresado por el baculovirus recombinante FB/his-VP3 [en ocasiones denominado en esta descripción FB/his-VP3 wt (tipo salvaje)]. Se indica la secuencia correspondiente a la cola de histidinas y el primer residuo aminoacídico correspondiente a VP3 (subrayado). Muestras correspondientes a extractos totales de células H5 (GIBCO), también identificadas en esta descripción como células H5, infectadas con FB/his-VP3, o a 10 la proteína his-VP3 purificada por afinidad fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3 (Figura 1B) o anti-cola de histidinas (anti-his tag) (Figura 1C) seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular.

La Figura 4 muestra la localización del sitio de corte proteolítico de la proteína VP3 de IBDV en células de insecto. La Figura 1A es un diagrama que representa de forma gráfica el grupo de proteínas his-VP3 delecionadas empleadas en la determinación de la posición del sitio de corte proteolítico de la proteína VP3 de IBDV en células de insecto. La Figura 1B muestra el resultado de un análisis mediante Western blot de las diferentes proteínas his-VP3 delecionadas expresadas en células H5 y purificadas por cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Extractos de cultivos de células H5 infectados con cada uno de los baculovirus recombinantes fueron sometidos a purificación en columnas de afinidad HiTrap (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas purificadas fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular. Las flechas indican la posición de la proteína completa (F) y la correspondiente a la forma proteolizada (T).

La Figura 5 ilustra que el procesamiento proteolítico de VP3 de IBDV en células de insecto produce la eliminación de un péptido de 1.560 Da del extremo C-terminal de his-VP3. Extractos de células H5 infectadas con FB/his-VP3 fueron sometidos a purificación mediante IMAC y la proteína purificada resultante fue analizada mediante espectrometría de masas por triplicado. La Figura 5A muestra los resultados de uno de esos experimentos. Se determinó la presencia de dos polipéptidos de 32.004 y 30.444 Da, respectivamente, lo que demuestra que el procesamiento proteolítico produce la eliminación de un péptido de 1.560 Da del extremo C-terminal de his-VP3, tamaño que encaja con la masa molecular (1.576 Da) correspondiente a los 13 residuos C-terminales de la VP3 de IBDV cuya secuencia se muestra en la Figura 5B.

La Figura 6 muestra el efecto de la co-expresión de VP1 de IBDV sobre la proteólisis de his-VP3. La Figura 6A muestra la detección de complejos VP3/VP1. Células H5 fueron infectadas con FB/his-VP3 o con FBD/his-VP3-VP1. A las 72 h.p.i. las células fueron recogidas y los extractos correspondientes sometidos a purificación en columnas de afinidad HiTrap (Amersham Pharmacia Biotech). Muestras correspondientes a extractos totales (T) o a proteínas purificadas fueron sometidas a SDS-PAGE. Los geles fueron posteriormente teñidos con nitrato de plata. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular. La Figura 6B muestra los resultados de un análisis mediante Western blot de extractos de células H5 infectadas con FB/his-VP3, FBD/his-VP3-VP1, o coinfectadas con FB/his-VP3 y FB/VP1, respectivamente. Las células infectadas fueron recogidas a las 72 h.p.i. y homeogeneizadas. Los extractos correspondientes fueron sometidos a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

La Figura 7 ilustra la localización del dominio de oligomerización. La Figura 7A es un diagrama que representa de forma gráfica el grupo de proteínas his-VP3 delecionadas empleadas en la determinación de la posición del dominio de oligomerización de VP3. Las regiones delecionadas se indican con la línea de puntos. El nombre de cada mutante indica la localización de los residuos aminoacídicos eliminados en la secuencia de la proteína VP3 de IBDV. La Figura 7B muestra la detección de oligómeros de VP3. Las diferentes proteínas de deleción de his-VP3, purificadas por afinidad en columnas HiTrap (Amersham Pharmacia Biotech), fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a

peroxidasa. La Figura 1C muestra los resultados de un análisis por Western blot. Las muestras descritas en el apartado anterior (Figura 7B) fueron sometidas a electroforesis no desnaturizante seguida de análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La Figura 7D muestra la detección de oligómeros de VP3 producidos por mutantes de delección C-terminal de VP3. Las proteínas fueron purificadas fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

La Figura 8 muestra la determinación del efecto de la coexpresión de VP1 de IBDV sobre el procesamiento proteolítico de VP3 de IBDV y la distribución subcelular de las proteínas de la cápsida. La Figura 8A ilustra la detección de las proteínas VP1 y VP3 de IBDV acumuladas en células H5 infectadas con FB/Poly y FBD/Poly-VP1, respectivamente. Células infectadas fueron recogidas a 24, 48 y 72 h.p.i. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3 o anti-VP1, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular. La distribución subcelular de las proteínas VPX/2 (pVP2/VP2) y VP3 en células infectadas con FB/Poly y FBD/Poly-VP1 fue analizada por microscopía confocal (Figura 8B). Las células fueron fijadas a las 60 h.p.i., y, a continuación, incubadas con suero de conejo anti-VPX (anti-pVP2) y suero de rata anti-VP3 seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo acoplada a Alexa 488 (verde) y con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de rata acoplada a Alexa 488 (rojo). Las flechas indican la posición de los aviroplasmas formados por VPX/2 (pVP2/VP2) y VP3.

La Figura 9 ilustra la caracterización de las estructuras formadas por expresión de la poliproteína de IBDV en células infectadas con FB/Poly-VP1. La Figura 9A es un conjunto de micrografías de las estructuras obtenidas en las distintas fracciones. Células H5 fueron infectadas con FB/Poly (Poly) o con FBD/Poly-VP1 (Poly-VP1). A las 90 h.p.i. las células fueron recogidas y los extractos correspondientes empleados para la purificación de estructuras mediante gradientes de sacarosa. Después de la centrifugación se recogieron 6 alicuotas de 2 ml. Una parte de cada alicuota fue colocada sobre una rejilla, tefñida negativamente con acetato de uranilo, y analizada mediante observación al microscopio electrónico. Las fracciones #1 corresponden al fondo de los gradientes. No se muestran las

fracciones #6, que contenían proteína soluble y estructuras desensambladas. La barra corresponde a 200 nm. La Figura 9B es una micrografía que muestra VLPs purificadas a partir de células infectadas con FBD/Poly-VP1. La imagen corresponde a la fracción #5 del gradiente obtenido a partir de células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los recuadros ampliados muestran 2 VLPs a una amplificación mayor. La Figura 9C muestra la caracterización de los polipéptidos presentes en la fracción #5 de ambos gradientes. Una muestra de la fracción #5 de cada gradiente fue sometida a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP1, anti-VPX (anti-pVP2/VP2) o anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. Se indica la posición de VPX (pVP2), VP2, VP3 completa (F) y VP3 proteolizada (T).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención proporciona una cápsida viral vacía completa del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), en adelante VLP completa (VLPs completas, en plural) de IBDV de la invención, caracterizada porque contiene todas las proteínas presentes en viriones purificados e infectivos de IBDV, concretamente, las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1 de IBDV.

El término “IBDV”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradosi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19:509-43].

Los términos “poliproteína viral” o “poliproteína de IBDV” se utilizan indistintamente en esta descripción y se refieren al producto resultante de la expresión del segmento A del genoma de IBDV cuyo procesamiento proteolítico da lugar a las proteínas VPX (pVP2), VP3 y VP4, e incluyen a las diferentes formas de las poliproteínas representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB & Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como proteínas sustancialmente homólogas a dicha poliproteína de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dicha poliproteína de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

El término “proteína VP1 de IBDV” se refiere al producto resultante de la expresión del segmento B del genoma de IBDV e incluye a las diferentes formas de las proteínas VP1 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83) así como proteínas sustancialmente homólogas a dicha proteína VP1 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dicha proteína VP1 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

Las proteínas VPX (pVP2), VP2 y VP3 de IBDV presentes en las VLPs completas de IBDV de la invención pueden ser cualquiera de las proteínas VPX, VP2 y VP3 representativa de cualquier cepa de IBDV, obtenidas por procesamiento proteolítico de la poliproteína viral, por ejemplo, las proteínas VPX, VP2 y VP3 de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136].

La proteína VP1 de IBDV presente en las VLPs completas de IBDV de la invención puede ser cualquier proteína VP1 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína VP1, longitud completa, de IBDV cepa Soroa, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ. ID. NO: 2.

En una realización particular, las VLPs completas de IBDV de la invención presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de los viriones de IBDV.

Las VLPs completas de IBDV de la invención pueden obtenerse mediante la expresión simultánea de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV en células hospedadoras apropiadas. Dichas células hospedadoras apropiadas son células que contienen la secuencia de nucleótidos codificante de la poliproteína de IBDV bajo el control de un promotor apropiado y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP1 de IBDV bajo el control de otro promotor apropiado, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes. En una realización particular, dichas células hospedadoras apropiadas son células transformadas, transfectadas o infectadas con un sistema de expresión adecuado, tal como (1) un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la poliproteína de IBDV bajo el control de un promotor y la

secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP1 de IBDV bajo el control de otro promotor distinto al que está unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la poliproteína viral, o bien, alternativamente, (2) un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la poliproteína de IBDV, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP1 de IBDV, cada una de ellas bajo el control de un promotor apropiado. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula de insecto y dichos promotores son promotores de baculovirus.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha poliproteína de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP1 de IBDV, en forma de dos ORFs independientes cuya expresión viene regulada por sendos promotores diferentes que regulan la expresión génica de cada una de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV. Por tanto, la invención proporciona una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho segundo promotor. El empleo de dichos promotores distintos permite la regulación independiente y simultánea de la expresión génica de dichas poliproteína y proteína VP1 de IBDV.

Una característica de la construcción génica proporcionada por esta invención es que comprende las secuencias de nucléótidos que codifican para todos los elementos proteicos presentes en los viriones purificados e infectivos de IBDV, concretamente, las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “ORFs (o fases de lectura abiertas) correspondientes a la poliproteína de IBDV” u “ORF (fase de lectura abierta) correspondiente a la proteína VP1 de IBDV” incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas ORFs, otras ORFs análogas a las mismas codificantes de la poliproteína viral y de la VP1 de IBDV. El término “análogo/a”, tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre

la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de la poliproteína viral y la VP1 de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, ventajosamente de, al menos, un 70%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 85%, aún más preferentemente de, al menos, un 90% y, todavía más preferentemente de, al menos, un 95%.

Los promotores que pueden ser utilizados en la puesta en práctica de la presente invención comprenden, en general, una secuencia de ácido nucleico a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción del ARNm y expresar dichas ORFs correspondientes a la poliproteína viral y a la proteína VP1 de IBDV en células hospedadoras apropiadas. Aunque prácticamente cualquier promotor que satisfaga esas condiciones puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención, por ejemplo, promotores de origen viral, bacteriano, de levaduras, animal, vegetal, etc., en una realización particular, dichos promotores son promotores virales, por ejemplo, promotores de baculovirus.

La expresión de cada una de dichas secuencias de nucleótidos codificantes para dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV, en forma de dos ORFs independientes, viene regulada por sendos promotores diferentes que regulan la expresión génica de cada una de dichas proteínas. En una realización particular, la expresión génica de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV se lleva a cabo en células de insecto infectadas o co-infectadas con baculovirus recombinantes (rBVs) que contienen las secuencias de nucleótidos codificantes de dichas proteínas, bien en un único rBV (rBV dual) o bien en dos rBV (en cuyo caso uno de dichos rBV contiene la secuencia codificante de la poliproteína de IBDV y el otro la secuencia codificante de la proteína VP1 de IBDV) bajo el control de promotores de baculovirus.

Prácticamente cualquier promotor de baculovirus puede ser utilizado siempre y cuando sea capaz de regular de forma eficaz la expresión de la secuencia codificante a la que está operativamente unida. A modo ilustrativo, dicho primer promotor de baculovirus puede

ser el promotor de la proteína p10 del baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNV), el promotor de la polihedrina del baculovirus AcMNPV, etc. y dicha segundo promotor de baculovirus puede ser el promotor de la proteína p10 de AcMNPV y el promotor de la polihedrina de AcMNPV. De forma más concreta, en una realización particular, dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la proteína p10 de AcMNPV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV, mientras que en otra realización particular, dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la proteína 10 de AcMNPV.

10 En una realización particular, la construcción génica proporcionada por esta invención comprende:

- 15 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de un baculovirus, y
- (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de un baculovirus,

20

en donde dichos primer y segundo promotores de baculovirus son distintos.

25 El empleo de promotores diferentes de baculovirus permite la regulación independiente y simultánea de la expresión génica de dichas poliproteína y proteína VP1 de IBDV en células de insecto.

En una realización concreta, la construcción génica proporcionada por esta invención comprende la secuencia codificante de la poliproteína de IBDV bajo el control de un primer promotor de baculovirus y la secuencia codificante de la proteína VP1 de IBDV bajo el control de un segundo promotor de baculovirus, distinto al primero, tal como la construcción génica denominada "Poly-VP1" en esta descripción, que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ. ID. NO: 1; dicha construcción génica Poly-VP1 contiene la secuencia codificante de la poliproteína de IBDV bajo el control del promotor de

la polihedrina de AcMNV y la secuencia codificante de la proteína VP1 de IBDV bajo el control del promotor de la proteína p10 de AcMNV.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión seleccionado entre:

5 a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho segundo promotor;

10 y

15 b) un sistema de expresión que comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha primera construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha segunda construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor.

20

25

En el segundo caso [b]), dicho primer promotor y dicho segundo promotor, al estar 30 en construcciones génicas diferentes, pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Las características de las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV y a la proteína VP1 de IBDV han sido previamente definidas en relación con la construcción génica proporcionada por esta invención. Los promotores que pueden ser utilizados en el

sistema de expresión proporcionado por esta invención han sido previamente definidos en relación con la construcción génica proporcionada por esta invención. A modo ilustrativo, dichos promotores pueden ser promotores de origen viral, bacteriano, de levaduras, animal, vegetal, etc.

5 En una realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucléotidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de la proteína p10 de AcMNV o el promotor de la polihedrina de AcMNV, y (ii) una secuencia de nucléotidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de la proteína p10 de AcMNV o el promotor de la polihedrina de AcMNV, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus.

10

15

En otra realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de la proteína p10 de AcMNV o el promotor de la polihedrina de AcMNV, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de la proteína p10 de AcMNV o el promotor de la polihedrina de AcMNV. En esta realización particular, dicho primer promotor de baculovirus y dicho segundo promotor de baculovirus, al estar en construcciones génicas diferentes, pueden ser iguales o diferentes entre sí.

20

25

30

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en el sistema de expresión proporcionado por esta invención incluyen las secuencias

necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señales de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc.

5 Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación del sistema de expresión proporcionado por esta invención dependiendo de las condiciones y necesidades de cada caso concreto. A modo ilustrativo, dichos sistemas o vectores de expresión apropiados pueden ser plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales 10 basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, virus, que pueden contener, además, si se desea, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano, para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas, etc., preferentemente, plásmidos, bácmidos o virus.

15 Estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un plásmido, tal como el plásmido denominado pFBD/Poly-20 VP1 en esta descripción, o un bácmido, tal como el bácmido recombinante denominado Bac/pFBD/Poly-VP1 en esta descripción, que contienen la construcción génica Poly-VP1 previamente definida, o bien un virus, tal como el baculovirus recombinante (rBV) denominado FBD/Poly-VP1 en esta descripción, que contiene la construcción génica Poly-VP1 y expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas (poliproteína y VP1 de IBDV) simultáneamente en células de insecto, o los rBVs que expresan la poliproteína de 25 IBDV y la proteína VP1 de IBDV, de forma separada y simultánea, cuando co-infectan células de insecto, obteniéndose VLPs completas de IBDV.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que contiene la secuencia de nucleótidos codificante de la poliproteína de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP1 de IBDV, cada una de ellas bajo el control de un promotor apropiado que permite la regulación simultánea e independiente de dichas poliproteína y proteína VP1 de IBDV, bien en una única construcción génica (en cuyo caso los promotores unidos a cada una de dichas secuencias codificantes serían diferentes entre sí) o bien en dos construcciones génicas diferentes. Por tanto, dicha célula hospedadora puede

contener una construcción génica proporcionada por esta invención o bien un sistema de expresión proporcionado por esta invención.

La célula hospedadora proporcionada por esta invención puede ser una célula hospedadora transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención.

En una realización particular la célula hospedadora proporcionada por esta invención es una célula hospedadora transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende una construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho segundo promotor.

Alternativamente, en otra realización particular, dicha célula hospedadora es una célula hospedadora transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha primera construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha segunda construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor; en esta realización particular, dicho primer promotor y dicho segundo promotor, al estar en construcciones génicas diferentes, pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Aunque, en cualquiera de las realizaciones mencionadas previamente, virtualmente cualquier promotor podría ser utilizado, en la práctica se prefiere que dichos promotores sean útiles en bacterias, levaduras, virus, células de animales, por ejemplo, en células de

mamífero, células aviares, células de insecto, etc.; en una realización particular, dichos promotores son promotores de baculovirus, tales como, por ejemplo, el promotor de la polihedrina de AcMNV o el promotor de la proteína p10 de AcMNV.

Prácticamente cualquier célula hospedadora susceptible de ser transformada, 5 transfectada o infectada por un sistema de expresión proporcionado por esta invención puede ser utilizada, por ejemplo, bacterias, células de mamífero, células aviares, células de insecto, etc.

En una realización particular, dicha célula hospedadora es una bacteria transformada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende una 10 construcción génica proporcionada por esta invención que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV, cada una de ellas operativamente unida a un promotor diferente, tal como la construcción génica identificada como Poly-VP1. Un cultivo de bacterias *Escherichia coli* 15 cepa DH5, transformadas con dicha construcción génica Poly-VP1, e identificadas como DHS-pFBD/Poly-VP1 ha sido depositado en la CECT con el número de depósito CECT 5777.

Alternativamente, dicha célula hospedadora es una célula de insecto. Las células de insecto son adecuadas cuando el sistema de expresión comprende uno o dos rBVs. El empleo 20 de rBVs es ventajoso por cuestiones de bioseguridad relacionadas con el rango de huésped de los baculovirus, incapaces de replicar en otros tipos celulares que no sean de insecto.

Por tanto, en una realización particular, la invención proporciona una célula hospedadora, tal como una célula de insecto, infectada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención, tal como un rBV, que comprende una construcción génica 25 proporcionada por esta invención que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV, cada una de ellas operativamente unida a un promotor diferente de baculovirus, tal como la construcción génica identificada como Poly-VP1.

30 En otra realización particular, la invención proporciona una célula hospedadora, tal como una célula de insecto, co-infectada con un sistema de expresión que comprende (1) un primer rBV que comprende una construcción génica que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV y (2) un segundo rBV que comprende una

construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV, estando cada una de dichas secuencias codificantes operativamente unida a un promotor, igual o diferente entre sí, de baculovirus.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de VLPs completas de IBDV de la invención que comprende cultivar una célula hospedadora proporcionada por esta invención que contiene una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV y una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes, y que expresa simultáneamente dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV, y, si se desea, recuperar dichas VLPs completas de IBDV de la invención.

En una realización particular, dicha célula hospedadora proporcionada por esta invención es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión adecuado proporcionado por esta invención, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho primer promotor; o bien, alternativamente, con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende (1) una primera construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV y (2) una segunda construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV, estando cada una de dichas secuencias de nucleótidos que comprenden las ORFs correspondientes a la poliproteína viral y a la proteína VP1 de IBDV bajo el control de sendas secuencias de nucleótidos que comprenden sendos promotores, iguales o diferentes entre sí.

Dicho procedimiento comprende, por tanto, la co-expresión génica simultánea de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV como dos ORFs independientes. Tras la expresión simultánea de dichas poliproteína viral y proteína VP1 en dichas células, la poliproteína es procesada proteolíticamente y las proteínas resultantes se ensamblan y

forman las VLPs completas de IBDV de la invención, constituidas por VPX, VP2, VP3 y VP1, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y purificación de dichas VLPs completas de IBDV de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

5 Aunque la célula hospedadora a cultivar puede ser cualquiera de las definidas previamente, en una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula de insecto.

Por tanto, en una realización concreta, la co-expresión génica simultánea de la 10 poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV en una célula hospedadora apropiada, tal como una célula de insecto, se realiza mediante el empleo de un rBV dual que permite la expresión simultánea de dichas proteínas a partir de dos ORFs independientes, cada una de ellas bajo el control de un promotor de baculovirus diferente capaz de regular simultánea e independientemente la expresión de dichas proteínas en células de insecto. En este caso, la 15 producción de las VLPs completas de IBDV de la invención puede realizarse mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un rBV dual que contiene una construcción génica que comprende simultáneamente las ORFS correspondientes a dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV, tal como el rBV denominado FBD/Poly-VP1 en esta descripción, o bien, 20 alternativamente, la obtención de un rBV que contiene una construcción génica que comprende la ORF correspondiente a la poliproteína de IBDV y la obtención de otro rBV que contiene una construcción génica que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV, seguido de la infección de células de insecto con dicho sistema de expresión basado en dicho(s) rVB(s), expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, 25 aislamiento de las VLPs completas de IBDV de la invención formadas, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs completas de IBDV de la invención.

De forma más concreta, en una realización particular, el procedimiento para la obtención de VLPs completas de la invención se caracteriza porque la célula hospedadora es una célula de insecto y comprende las etapas de:

30

- a) preparar un sistema de expresión proporcionado por esta invención constituido por (1) un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs

correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a un promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y por (2) un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a un promotor de un baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción;

5

10 b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

15 c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar VLPs completas de IBDV; y

d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs completas de IBDV.

Asimismo, en otra realización particular, el procedimiento para la obtención de VLPs 20 completas de la invención se caracteriza porque la célula hospedadora es una célula de insecto y comprende las etapas de:

25 a) preparar un sistema de expresión constituido por un baculovirus recombinante dual que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de

30

control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicho promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus;

5 b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar VLPs completas de IBDV; y

10 d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs completas de IBDV.

La construcción de un rBV dual que permite la expresión de forma simultánea de la poliproteína de IBDV y de la proteína VP3 de IBDV puede ser realizada por un experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. Gene 160:191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol 67:4566-79). De forma similar puede obtenerse un rBV que contiene la construcción génica que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV y un rBV que contiene una construcción génica que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV.

En relación con esto, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de un rBV dual que permite la expresión simultánea de la poliproteína de IBDV y de la proteína VP1 de IBDV a partir de dos ORFs independientes y controladas, cada una de ellas, por un promotor de baculovirus diferente, en células de insecto, que comprende:

30 a) construir un plásmido portador de una construcción génica que contiene (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de un baculovirus, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a

la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de un baculovirus, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus y permiten la regulación simultánea de la expresión génica de dichas poliproteína y proteína VP1 de IBDV;

5 b) obtener un bácmido recombinante, que permite la expresión de forma simultánea durante su ciclo replicativo de la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dichos promotores de baculovirus, mediante la transformación de bacterias competentes con el plásmido obtenido en a); y

10 c) obtener un baculovirus recombinante dual, que permite la expresión simultánea de las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dichos promotores de baculovirus, mediante transformación de células de insecto con el bácmido recombinante de b).

15

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “bacterias competentes” se refiere a bacterias que pueden contener el genoma de un baculovirus, por ejemplo, AcMNV, opcionalmente modificado genéticamente, que permite la recombinación con plásmidos 20 donadores.

En una realización particular, dicho procedimiento de obtención de rBVs duales se caracteriza porque:

25 - dicha primera secuencia promotora de baculovirus comprende el promotor de la proteína p10 de AcMNV y dicha segunda secuencia promotora de baculovirus comprende el promotor de la polihedrina de AcMNPV, o viceversa;

- el plásmido obtenido en a) es el identificado como pFBD/Poly-VP1 en esta descripción;

- las bacterias competentes transformadas en b) son *Escherichia coli* DH10Bac;

- el bácmido recombinante obtenido en b) es el identificado como Bac/pFBD/Poly- 30 VP1 en esta descripción; y

- el rBV dual obtenido es el identificado como FBD/Poly-VP1.

El rBV dual así obtenido puede ser utilizado, si se desea, para obtener VLPs completas de IBDV de la invención. Para ello, se infectan células de insecto con dicho rBV

dual. Prácticamente, cualquier célula de insecto puede ser utilizada; no obstante, en una realización particular, dichas células de insecto son células H5 o células de *Spodoptera frugiperda* Sf9.

Alternativamente, como se ha mencionado antes, pueden obtenerse VLPs completas de la invención mediante la infección conjunta (co-infección) de células de insecto con un rBV que permite la expresión de la poliproteína de IBDV en células de insecto y con un rBV que permite la expresión de la proteína VP1 de IBDV en células de insecto. Dichos rBVs pueden obtenerse según lo mencionado previamente. Prácticamente, cualquier célula de insecto puede ser utilizada; no obstante, en una realización particular, dichas células de insecto son células H5 o células de *Spodoptera frugiperda* Sf9.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de rBVs útiles para la producción de VLPs completas de IBDV. En una realización particular, los baculovirus recombinantes obtenidos son duales, es decir, un mismo baculovirus recombinante es capaz de expresar en células hospedadoras apropiadas la poliproteína viral y la proteína VP1 de IBDV a partir de dos ORFs independientes y controladas por promotores diferentes de baculovirus. La expresión simultánea en una misma célula hospedadora de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV permite la formación de VLPs completas de IBDV. En otra realización particular, se obtienen unos baculovirus recombinantes capaces de expresar en células hospedadoras apropiadas la poliproteína viral a partir de una secuencia de ácido nucleico que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV bajo el control de un promotor de baculovirus y unos baculovirus recombinantes capaces de expresar en células hospedadoras apropiadas la proteína VP1 de IBDV a partir de una secuencia de ácido nucleico que comprende la ORF correspondiente a la VP1 de IBDV bajo el control de un promotor, igual o diferente al que regula la expresión de la poliproteína viral en dichos baculovirus recombinantes capaces de expresar la poliproteína viral. La infección conjunta (co-infección) de células hospedadoras apropiadas, tales como células de insecto, con dichos baculovirus recombinantes capaces de expresar la poliproteína viral y con dichos baculovirus recombinantes capaces de expresar la proteína VP1 de IBDV, permite la expresión simultánea en dichas células co-infectadas de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV, lo que permite la formación de VLPs completas de IBDV. Los baculovirus recombinantes resultantes constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del sistema de expresión

génica proporcionado por esta invención para la producción de VLPs completas de IBDV de la invención, las cuales constituyen un aspecto adicional de esta invención.

Las VLPs completas de IBDV de la invención pueden ser utilizadas para inmunizar animales, en particular, aves, *per se* o como vectores o vehiculizadores de moléculas con actividad biológica, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización particular, dichas moléculas con actividad biológica incluyen antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien fármacos que se liberan en su sitio de acción específico, o bien secuencias de ácido nucleico, todas ellas útiles en terapia génica y destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las VLPs completas de IBDV de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, aves, frente al virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV). En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de VLPs completas de IBDV de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, aves, frente al virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV). En una realización particular, dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger pollos de la infección causada por IBDV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de VLPs completas de IBDV de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las VLPs completas de IBDV de la invención y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o

suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía 5 de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítopo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

10 Los siguientes Ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma. El Ejemplo 1 pone de manifiesto que la delección del extremo C-terminal de la proteína VP3 de IBDV impide la formación de VLPs de IBDV, mientras que el Ejemplo 2 describe la generación de un baculovirus recombinante que co-expresa las fases 15 de lectura abierta A1 y B1 del genoma de IBDV y el Ejemplo 3 ilustra la obtención de VLPs completas de IBDV a partir de células H5 infectadas con el baculovirus recombinante FBD/Poly-VP1. Para la puesta en práctica de dichos Ejemplos, se utilizaron los materiales y métodos que se describen a continuación.

MATERIALES Y METODOS

20 **Células y virus.** Los virus recombinantes VT7/VP3, VT7/PolyΔ907-1012, FB/Poly, FB/his-VP3 (wt), FB/his-VP3Δ253-257, FB/his-VP3Δ1-25, FB/his-VP3Δ26-52, FB/his-VP3Δ53-77, FB/his-VP3Δ78-100, FB/his-VP3Δ101-124, FB/his-VP3Δ125-150, FB/his-VP3Δ151-175, FB/his-VP3Δ176-200, FB/his-VP3Δ201-224 y FB/his-VP3Δ216-257 fueron descritos previamente (Fernández-Arias A et al. 1997. The major antigenic protein of 25 infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. J Virol. 71:8014-8; Kadono-Okuda K et al. 1995. Baculovirus-mediated production of the human growth hormone in larvae of the silkworm, Bombyx mori. Biochem Biophys Res Commun. 213:389-96; Kochan G et al. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. 2003. Archives of Virology 148:723-744; Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. 30 Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. Virology. 278:322-31).

Los experimentos de expresión fueron llevados a cabo con células BSC-1 (American Type Culture Collection, ATCC; Catálogo CCL26), H5 [HighFiveTM (GIBCO)] y Sf9

(GIBCO). Las células BSC-1 fueron cultivadas en medio de Dulbecco modificado por Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células H5 y Sf9 fueron cultivadas en medio TC-100 (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Los virus fueron amplificados y titulados siguiendo protocolos previamente descritos (Lombardo E et al.

5 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. Virology. 277:345-57; Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. Virology. 278:322-31).

El aislado de IBDV utilizado fue IBDV cepa Soroa.

10

Generación de baculovirus recombinantes. El plásmido pFB/his-VP3, previamente descrito, fue utilizado como molde en la generación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de los fragmentos de ADN empleados en la construcción de los vectores plasmídicos necesarios para la construcción de los baculovirus recombinantes FB/his-VP3 Δ 248-257, FB/his-VP3 Δ 243-257, FB/his-VP3 Δ 238-257, FB/his-VP3 Δ 233-257, y FB/his-VP3 Δ 228-257. Las reacciones de PCR fueron realizadas empleando un iniciador 5' común (SEQ. ID. NO: 4) y un iniciador 3' específico para cada mutante (Tabla 1).

Tabla 1

20 **Generación de mutantes de delección del extremo carboxi terminal de His-VP3**

| Mutante | Secuencia |
|--------------------------|----------------|
| His-VP3 Δ 248-257 | SEQ. ID. NO: 5 |
| His-VP3 Δ 243-257 | SEQ. ID. NO: 6 |
| His-VP3 Δ 238-257 | SEQ. ID. NO: 7 |
| His-VP3 Δ 233-257 | SEQ. ID. NO: 8 |
| His-VP3 Δ 228-257 | SEQ. ID. NO: 9 |

Tras las reacciones de PCR, los fragmentos de ADN correspondientes fueron purificados y digeridos con los enzimas de restricción *Apal* y *KpnI* y ligados al plásmido pFB/his-VP3 (Kochan G et al. 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a 25 major structural protein of IBDV. Archives of Virology 148:723-744) previamente digerido con los mismos enzimas. De esta manera se generó la serie de plásmidos denominados genéricamente pFB/his- Δ VP3 (pFB/his-VP3 Δ n-n' de forma más específica, donde n y n' indican los límites de la región deleciónada) que contienen delecciones en el extremo 5' de la región codificante de VP3.

La construcción de los vectores plasmídicos requeridos para la generación de los baculovirus recombinantes FB/PolyΔ1008-1012, FB/PolyΔ1003-1012 y FB/PolyΔ998-1012 fue realizada mediante la substitución del fragmento *Xba* I (343 pares de bases) por sus homólogos, conteniendo las delecciones deseadas, procedentes de los plásmidos FB/his-5 VP3Δ233-257, FB/his-VP3Δ248-257, y FB/his-VP3Δ243-257, respectivamente.

La construcción del vector plasmídico pFB/VP1 se realizó mediante clonaje de un fragmento de ADN, que contiene la fase de lectura abierta del gen de la proteína VP1 de IBDV, a partir del plásmido pBSKVP1 (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the 10 capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83) mediante digestión del plásmido con el enzima de restricción *Cla*I seguido por tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y posterior tratamiento con el enzima *Not*I. Este fragmento fue subclonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas de restricción *Stu*I y *Not*I. El plásmido resultante se 15 denominó pFB/VP1.

Los vectores plasmídicos pFBD/his-VP3-VP1 y pFBD/Poly-VP1 fueron construidos mediante la inserción de las fases de lectura abierta de los genes de las proteínas VP3 y VP1 en el vector pFastBacDual (Invitrogen). pFBD/VP1 fue generado mediante inserción de un fragmento que contiene la fase de lectura abierta de VP1 obtenido mediante digestión con el enzima *Not*I, seguido por tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y posterior tratamiento con el enzima *Xhol*, en el vector pFastBacDual (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas *Xhol* y *Pvu*II. A continuación, el plásmido pFB/his-VP3 (Kochan G et al. 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. Archives of Virology 148:723-744) fue digerido con los enzimas 20 *Not*I y *Rsr*II, y el fragmento resultante conteniendo la fase de lectura abierta his-VP3 fue insertado en el plásmido pFBD/VP1 previamente digerido con los enzimas *Not*I y *Rsr*II. El plásmido resultante se denominó pFBD/his-VP3-VP1. De forma similar, la fase de lectura abierta correspondiente a la poliproteína de IBDV fue aislada a partir del plásmido pCIneoPoly (Maraver A et al. Identification and molecular characterization of the RNA 25 polymerase-binding motif of the inner capsid protein VP3 of infectious bursal disease virus. J. Virol. 77:2459-2468) mediante digestión con los enzimas *Eco*RI y *Not*I. El fragmento de ADN correspondiente fue clonado en el plásmido pFBD/VP1 previamente digerido con los enzimas *Eco*RI y *Not*I, dando lugar al vector denominado pFBD/Poly-VP1.

Los baculovirus recombinantes descritos anteriormente fueron generados usando el sistema Bac-to-Bac siguiendo los protocolos descritos por el fabricante (Invitrogen).

Purificación mediante gradientes de sacarosa y caracterización de las estructuras derivadas de la expresión de la poliproteína de IBDV. Células BSC-1 o H5 fueron infectadas con los virus vacunales o baculovirus recombinantes descritos. Las células infectadas fueron recogidas, lisadas y procesadas como se ha descrito anteriormente (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83; Castón JR et al. 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the the number for capsid assembly. J. Virol. 75:10815-28).

Microscopía electrónica. Aliquots de 5 µl de las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa analizados se colocaron sobre rejillas de microscopía electrónica. Las muestras así preparadas fueron teñidas negativamente con una solución al 2% de acetato de uranilo. Las micrografías fueron obtenidas con un microscopio Jeol 1200 EXII operando a 100 kV con magnificaciones de 20.000 ó 40.000 X.

Purificación de proteínas de fusión his-VP3 y derivados mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Células H5 o Sf9 infectadas con los diferentes virus recombinantes descritos fueron recogidas a las 72 h.p.i. Después de lavar dos veces en tampón fostato salino (PBS) las células fueron resuspendidas en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) y mantenidas en hielo durante 20 minutos. A continuación, las muestras fueron sometidas a centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes correspondientes fueron sometidos a purificación mediante IMAC utilizando una resina unida a cobalto (Talon, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

30

Electroforesis y Western blot. Las muestras de proteína fueron resuspendidas en tampón de Laemmli (King J & Laemmli UK. 1973. Bacteriophage T4 tail assembly: structural proteins and their genetic identification. J Mol Biol. 1973 Apr 5;75(2):315-37) y

sometidas a calentamiento a 100°C durante 5 minutos. Las electroforesis fueron realizadas en geles al 11% de poliacrilamida. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante *electroblotting*. Antes de la incubación con antisueros específicos las membranas fueron bloqueadas mediante incubación, durante 1 h a 5 temperatura ambiente, con leche en polvo al 5% diluida en PBS.

Inmunofluorescencia (IF) y microscopía confocal (CLSM). Células BSC-1 o H5 fueron crecidas sobre cubres e infectadas con los recombinantes de virus vacunal o baculovirus. A los tiempos post-infección indicados las células fueron lavadas dos veces con 10 PBS y fijadas con metanol a -20°C durante 10 minutos. Tras la fijación, los cubres fueron secados al aire, bloqueados en una solución de suero de ternera recién nacida al 20% en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente, e incubados con los antisueros indicados. Las muestras fueron visualizadas mediante epifluorescencia empleando un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con un sistema confocal Bio-Rad Radiance 2100. Las imágenes 15 fueron obtenidas empleando los programas Laser Sharp software package (Bio-Rad).

Análisis mediante espectrometría de masas (MS). Las proteínas fueron pasadas a través de minicolumnas C-18 ZipTip tips (Millipore, Bedford, MA, USA) y eluidas en solución matriz (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico saturado en solución acuosa de 33% 20 acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluoroacético). Una alícuota de 0,7 µl de la mezcla resultante fue depositada en una sonda MALDI de acero que fue posteriormente secada al aire. Las muestras fueron analizadas empleando un espectrómetro de masas Bruker Reflex™ IV MALDI-TOF (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Alemania) equipado con una fuente SCOUT™ reflector en modo reflector ión positivo empleando extracción retardada. 25 El voltaje de aceleración fue de 20 kV. El equipo fue calibrado externamente empleando señales de masa correspondientes a BSA y dímeros de BSA que cubre el rango de 20-130 m/z.

EJEMPLO 1

30 **La delección del extremo C-terminal de la proteína VP3 elimina la formación de VLPs de IBDV**

Recientemente se ha descrito que el extremo C-terminal de VP3 contiene el dominio responsable de la interacción de esa proteína con la proteína VP1 (Maraver A et al.

Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of the inner capsid protein VP3 of infectious bursal disease virus). Por ello, se decidió analizar el posible papel de la región C-terminal de VP3 en la morfogénesis de las VLPs de IBDV. Como punto de partida para este análisis se empleó el virus vacunal recombinante denominado VT7/PolyΔ907-1012 que expresa una forma delecionada de VP3 que carece de los 105 residuos del extremo C-terminal (Sánchez Martínez AB. 2000. Caracterización de las modificaciones co y post-traduccionales de la poliproteína del virus de la bursitis infecciosa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas) (Figura 1A). El análisis mediante SDS-PAGE y Western blot mostró que la deleción no afecta al procesamiento proteolítico co-traduccional de la poliproteína (Sánchez Martínez AB. 2000. Tesis doctoral citada *supra*). La expresión de la proteína PolyΔ907-1012 da lugar a la formación de estructuras tubulares similares a los túbulos de tipo I formados en células infectadas con IBDV (Kaufer, I., and E. Weiss 1976. Electron-microscope studies on the pathogenesis of infectious bursal disease after intrabursal application of the causal virus. Avian Dis. 20:483-95). Las estructuras tubulares formadas por expresión de PolyΔ907-1012 se detectaron mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos anti-VPX/2 (anti-pVP2/VP2) y anti-VP3 (Figura 1B), y mediante microscopía electrónica de fracciones obtenidas mediante purificación en gradientes de sacarosa (Figura 1C). El análisis mediante Western blot confirmó la presencia de VPX y VP3 en los citados túbulos.

Con el fin de confirmar que el fenotipo mencionado era debido a la deleción dentro de la región correspondiente a VP3, se realizó un experimento co-infectando células BSC-1 con VT7/PolyΔ907-1012 y VT7/VP3. VT7/VP3 es un recombinante de virus vacunal que expresa la proteína VP3 completa (Fernández-Arias A et al. 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. J Virol. 71:8014-8). Un análisis realizado mediante microscopía confocal demostró que la co-expresión de la proteína VP3 completa produce una reducción significativa en la formación de túbulos de tipo I. En las células coinfectadas, la distribución subcelular de las proteínas VPX/VP3 se caracteriza por la formación de túbulos cortos y viroplasmas similares a los detectados en células infectadas con la poliproteína completa (Figura 1B). Esta observación indica que la co-expresión de la proteína VP3 completa rescata parcialmente la capacidad de la proteína PolyΔ907-1012 de formar VLPs. El análisis mediante microscopía electrónica de fracciones derivadas de la co-infección confirmó esta hipótesis. Así, las fracciones superiores del gradiente estaban muy enriquecidas en túbulos cortos y ensamblados quasi-esféricos,

denominados capsoides, con un diámetro de 60-70 nm, junto con una pequeña proporción de VLPs de contorno poligonal (Figura 1C). El análisis mediante Western blot de las fracciones superiores del gradiente, que contenían la mayor concentración de capsoides, puso de manifiesto que contenían una mayor proporción de proteína VP3 completa que de proteína 5 VP3 Δ 907-1012 (datos no mostrados). Este resultado indicó que la incorporación de la proteína VP3 completa en estas estructuras es más eficiente que la de la forma delecionada. Estos resultados demuestran que el extremo C-terminal de VP3 juega un papel fundamental en la morfogénesis de la cápsida de IBDV.

La proteína VP3 sufre un procesamiento proteolítico en células de insecto. Se ha 10 descrito anteriormente que la expresión de la poliproteína de IBDV en células de insecto produce el ensamblado de túbulos largos formados por hexámeros de trímeros de VPX (Da Costa, B., C. Chevalier, C. Henry, J. C. Huet, S. Petit, J. Lepault, H. Boot, and B. Delmas 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising 15 from the maturation process of pVP2. J Virol. 76:2393-402; Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. Virology. 278:322-31). La similitud entre los túbulos observados en células de mamífero infectadas con VT7/Poly Δ 907-1012 y los detectados en 20 células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresan la poliproteína completa llevó a analizar el estado de la proteína VP3 acumulada en células de insecto. Para ello, extractos de células infectadas con IBDV, VT7/Poly (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like 25 particles. J. Gen. Virol. 79: 1047-54) y FB/Poly, respectivamente, fueron analizados mediante Western blot usando suero anti-VP3 (Fernández-Arias A et al. 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. J Virol. 71:8014-8). En células infectadas con IBDV y VT7/Poly, se detectó mediante Western blot la presencia de una única banda de 29 kDa, el tamaño esperado de la proteína VP3 completa (Figura 2). Por el contrario, en células de insecto infectadas con FB/Poly se detectó mediante Western blot la presencia de dos bandas correspondientes a polipéptidos de 29 y 27 kDa, respectivamente (Figura 2). Un análisis de la expresión temporal demostró que aunque la 30 aparición del producto de 27 kDa está ligeramente retrasada con respecto a la aparición del producto de 29 kDa, pasa a ser predominante durante la fase tardía de la infección (Figura 8A). Un análisis similar realizado en celulas Sf9 produjo idénticos resultados (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que en células de insecto la proteína VP3 sufre una

modificación post-traduccional que da lugar a la acumulación de un producto de 27 kDa.

La infección de células de insecto con un baculovirus recombinante, FB/his-VP3, que expresa una versión de VP3 que contiene una cola de seis residuos de histidina (6xhis), denominada his-VP3 (Figura 3A), da lugar a la acumulación de dos formas moleculares de la 5 proteína de 32 y 30 kDa, respectivamente, similares a las observadas en células infectadas con FB/Poly (Kochan G et al. 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. Archives of Virology 148:723-744). Por ello, se utilizó FB/his-VP3 como herramienta para determinar el origen de la proteína VP3 de menor tamaño. Para ello, tanto extractos totales de células infectadas con FB/his-VP3 como 10 proteína purificada mediante IMAC fueron analizados mediante SDS-PAGE y Western blot empleando suero anti-VP3 (Figura 3B) y anti-6xhis (Figura 3C). Como se muestra en la Figura 3B, el polipéptido de 30 kDa se encuentra presente en la muestra de proteína purificada lo que demuestra que su extremo N-terminal permanece intacto. Por otra parte, tanto el producto de 32 kDa como el de 30 kDa son reconocidos por ambos antisueros 15 (Figuras 3B y 3C). Estos resultados indican muy fuertemente que en células de insecto la proteína VP3 sufre una proteólisis que da lugar a la acumulación de un producto que carece de un fragmento de 2 kDa en su extremo C-terminal. Con el fin de determinar firmemente esta posibilidad se emplearon seis baculovirus recombinantes denominados his-VP3Δ253-257, his-VP3Δ248-257, his-VP3Δ243-257, his-VP3Δ238-257, his-VP3Δ233-257 e his- 20 VP3Δ228-257, respectivamente (Figura 4A) [corresponden a los definidos en el apartado de Materiales y Métodos, sub-apartado Células y Virus, con igual nomenclatura pero precedidos por "FB/" (indicativo del nombre del plásmido empleado para generar los virus (pFastBac1)] . Estos baculovirus recombinantes expresan una serie de formas de delección de VP3 que contienen una cola de histidinas. Las delecciones fueron generadas para eliminar de 25 forma escalonada grupos de 5 residuos aminoacídicos y, así, generar una colección con delecciones crecientes en el extremo C-terminal de la proteína VP3 tal como se muestra en la Figura 4A. La expresión de estas proteínas fue analizada mediante Western blot empleando suero anti-VP3. Como se muestra en la Figura 4B, la expresión de la proteína completa his-VP3 (his-VP3 wt) y de la proteína mutante his-VP3Δ253-257 dio lugar a la formación de 30 dobletes. Por otro lado, las proteínas que contenían delecciones de 10 o más residuos migraron de acuerdo con su tamaño esperado dando lugar a una sola banda (Figura 4B). Este resultado demuestra que el extremo C-terminal de la proteína VP3 es procesado proteolíticamente y que la delección del sitio de corte evita la proteólisis. La movilidad

electroforética de la proteína his-VP3 Δ 248-257 es ligeramente inferior a la de los polipéptidos generados por procesamiento proteolítico de his-VP3 e his-VP3 Δ 253-257, lo que indica que el procesamiento tiene lugar en la región localizada entre los residuos 243 y 248. Probablemente, el externo C-terminal de la proteína his-VP3 Δ 248-257 es demasiado corto como para permitir el reconocimiento por parte de la proteasa, y, por ello, no sufriría el procesamiento proteolítico.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos con los mutantes de delección de his-VP3 y establecer de una forma precisa la posición de sitio de corte proteolítico en la proteína VP3, extractos de células H5 infectadas con FB/his-VP3 fueron sometidos a purificación mediante IMAC. La proteína purificada resultante fue analizada mediante espectrometría de masas. El experimento fue repetido tres veces empleando purificaciones independientes. Los resultados obtenidos fueron similares en todos los casos (una diferencia en masa inferior al 0,03%). La Figura 5A muestra los resultados de uno de estos experimentos. Se determinó la presencia de dos polipéptidos de 32.004 y 30.444 Da, respectivamente. Estos resultados muestran que el procesamiento proteolítico produce la eliminación de un péptido de 1.560 Da del externo C-terminal de his-VP3. Este tamaño encaja con la masa molecular (1.576 Da) correspondiente a los 13 residuos C-terminales de VP3 (SEQ. ID. NO: 3) (Figura 5B).

El conjunto de estos resultados demuestra que la proteína VP3 es procesada proteolíticamente en células de insecto entre los residuos L244 y G245, dando lugar a un polipéptido que carece de los 13 residuos C-terminales.

EJEMPLO 2

Generación de un baculovirus recombinante que co-expresa las fases de lectura abierta

A1 y B1 del genoma de IBDV

2.1 Construcción del plásmido pFBD/VP1

La secuencia nucleotídica correspondiente a la fase de lectura abierta B1 del genoma de IBDV se obtuvo a partir del plásmido pBSKVP1 descrito anteriormente (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83). El plásmido fue purificado y sometido a los siguientes tratamientos enzimáticos: i) digestión con el enzima de restricción *Not*I; ii) incubación con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* en presencia de dNTPs; y iii) digestión con el enzima de restricción *Xba*I. A continuación, el fragmento de

ADN correspondiente fue purificado y utilizado para su clonaje en el vector pFastBacDual (Invitrogen) previamente tratado con los enzimas de restricción *Xba*I y *Pvu*II. Para ello, el fragmento de ADN y el plásmido linearizado fueron incubados en presencia de la ADN ligasa de T4 para generar el plásmido pFBD/VP1.

5

2.2 Construcción del plásmido pFBD/Poly-VP1

La secuencia nucleotídica correspondiente a la fase de lectura abierta A1 del genoma de IBDV se obtuvo a partir del plásmido pCIneoPoly descrito anteriormente (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83). El plásmido fue purificado e incubado con los enzimas de restricción *Eco*RI y *Not*I. El fragmento de ADN correspondiente fue purificado e incubado con el plásmido pFBD/VP1, previamente digerido con los enzimas de restricción *Eco*RI y *Not*I, en presencia de la ADN ligasa de T4 para generar el plásmido pFBD/Poly-VP1. Un cultivo de bacterias transformadas con dicho plásmido pFBD/Poly-VP1 ha sido depositado en la CECT con el número de depósito CECT 5777.

2.3 Obtención del bácmido Bac/pFBD/Poly-VP1

Se realizó mediante transformación de bacterias competentes DH10Bac (Invitrogen), 20 selección de colonias positivas en medio selectivo y purificación siguiendo la metodología descrita por Invitrogen (números de catálogo 10359016 y 10608016).

2.4 Obtención del baculovirus recombinante FBD/Poly-VP1

El virus fue obtenido mediante transfección de células H5 (Invitrogen) con el 25 bácmido Bac/pFBD/Poly-VP1 previamente purificado siguiendo la metodología descrita por Invitrogen (números de catálogo 10359016 y 10608016).

EJEMPLO 3

Obtención de VLPs completas de IBDV a partir de células H5 infectadas con el baculovirus recombinante FBD/Poly-VP1

Cultivos de células H5 fueron infectadas con el virus recombinante FBD/Poly-VP1 (Ejemplo 2) empleando una multiplicidad de infección de 5 unidades formadoras de placas por célula. Los cultivos fueron recogidos a las 72 horas post-infección (h.p.i). Las células

fueron sedimentadas mediante centrifugación (1.500 x g durante 10 minutos). El sedimento celular fue resuspendido en tampón PES (PIPES (ácido 1,4-piperazidin etanosulfónico) 25 mM, pH 6,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 20 mM). A continuación, las células fueron homogeneizadas mediante tres ciclos consecutivos de congelación/descongelación (-5 70°C/+37°C). El homogenado correspondiente fue centrifugado (10.000 x g durante 15 minutos a 4°C). El sobrenadante resultante fue recogido y utilizado para la purificación de las VLPs. Para ello, se preparó un tubo de centrífuga con un colchón de sacarosa al 25% (peso/volumen), diluida en tampón PES, de 4 ml, sobre el que se depositaron 8 ml de sobrenadante. El tubo fue centrifugado (125.000 x g durante 3 h a 4°C). El sedimento 10 resultante se resuspendió en 1 ml de tampón PES. A continuación se preparó, en un tubo de centrífuga, un gradiente continuo de 25-50% de sacarosa en tampón PES, sobre el que se depositó el sedimento resuspendido. El tubo fue centrifugado (125.000 x g durante 1 h a 4°C). A continuación, el gradiente fue fraccionado en alícuotas de 1 ml.

Las diferentes alícuotas fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello se depositó un volumen de 5 µl de cada muestra sobre una rejilla de microscopio. Las muestras fueron teñidas negativamente con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2%. Se empleó un microscopio Jeol 1200 EXII operando a 100 kV y a una magnificación nominal de 40.000 X. Este análisis demostró la presencia de VLPs completas estructuralmente idénticas a los viriones de IBDV en las muestras analizadas.

20 Con el fin de determinar la composición proteica de las VLPs detectadas mediante microscopía electrónica, las muestras fueron analizadas mediante Western blot. Para ello las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles fueron posteriormente transferidos a nitrocelulosa e incubados con anticuerpos anti-VPX/2 (anti-pVP2/VP2), anti-VP3 y anti-VP1. Los resultados demostraron la presencia de las proteínas 25 VPX, VP2, VP3 y VP1 en las fracciones que contenían VLPs.

DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

Un cultivo de la bacteria derivada de DH5, portadora de un plásmido que contiene la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV (pFBD/Poly-VP1), DH5-pFBD/poly-VP1, 30 ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot, Valencia, España, el 8 de marzo de 2003, correspondiéndole el número de depósito CECT 5777.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho segundo promotor.

10

2. Construcción génica según la reivindicación 1, en la que dicho primer promotor es un promotor viral y dicho segundo promotor es un promotor viral diferente a dicho primer promotor.

15

3. Construcción génica según la reivindicación 1 ó 2, que comprende:

20

(i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de un baculovirus, y

25

(ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de un baculovirus,

en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus.

30

4. Construcción génica según la reivindicación 3, en la que dicho primer promotor de baculovirus se selecciona entre el promotor de la proteína p10 del baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNV) y el promotor de la polihedrina del baculovirus AcMNPV.

5. Construcción génica según la reivindicación 3, en la que dicho segundo promotor de baculovirus se selecciona entre el promotor de la proteína p10 de AcMNPV y el promotor de la polihedrina de AcMNPV.

5

6. Construcción génica según la reivindicación 3, en la que dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la proteína p10 de AcMNPV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV; o en la que dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la proteína p10 de AcMNPV.

10

7. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ. ID. NO: 1.

15

8. Un sistema de expresión seleccionado entre:

a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y

20

b) un sistema de expresión que comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha primera construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha segunda construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor.

25

30

9. Sistema de expresión según la reivindicación 8, que comprende una construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucléotidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus y (ii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus.

10

10. Sistema de expresión según la reivindicación 8, que comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus.

11. Sistema de expresión según la reivindicación 10, en el que dicho primer promotor de baculovirus y dicho segundo promotor de baculovirus son iguales o diferentes entre sí.

25

12. Sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, seleccionado entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos y virus, que pueden contener, opcionalmente, un origen de replicación heterólogo.

13. Una célula hospedadora que contiene una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

5 14. Una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

15. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, seleccionada entre bacterias y células animales.

10 16. Célula según la reivindicación 15, caracterizada porque es la bacteria identificada como DH5-pFBD/Poly-VP1 depositada en la CECT con el número de depósito CECT 5777.

15 17. Célula según la reivindicación 15, seleccionada entre células de insecto, células aviares y células de mamífero.

18. Un baculovirus recombinante dual que expresa simultáneamente la poliproteína de IBDV y la proteína VP1 de IBDV a partir de (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, y de (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus.

25 19. Empleo de un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, o de un baculovirus recombinante dual según la reivindicación 17, para la producción de cápsidas virales vacías completas de IBDV.

30 20. Un procedimiento para la producción de cápsidas virales vacías completas del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs completas de IBDV] que comprende cultivar una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, y, si se desea, recuperar dichas VLPs completas de IBDV.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula hospedadora es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a dicha poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho primer promotor.

22. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula hospedadora es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (1) una primera construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a dicha poliproteína de IBDV y (2) una segunda construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV, estando cada una de dichas secuencias de nucleótidos que comprenden las ORFS correspondientes a la poliproteína viral y a la proteína VP1 de IBDV bajo el control de sendas secuencias de nucleótidos que comprenden sendos promotores, iguales o diferentes entre sí.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, en el que dicha célula hospedadora es una célula de insecto.

24. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula hospedadora es una célula de insecto, que comprende las etapas de:

a) preparar un sistema de expresión constituido por un baculovirus recombinante dual que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, estando dicha construcción

génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicho promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus;

5 10 b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para 15 formar VLPs completas de IBDV; y

d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs completas de IBDV.

25. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula hospedadora es 20 una célula de insecto, que comprende las etapas de:

a) preparar un sistema de expresión constituido por (1) un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a un promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos 25 elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y por (2) un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura 30 abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a un promotor de un baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción;

5 b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

5 c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar VLPs completas de IBDV; y

10 d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs completas de IBDV.

10 26. Cápsidas vacías completas del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs completas de IBDV], obtenidas según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25.

15 27. Cápsidas vacías completas del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs completas de IBDV], caracterizadas porque contienen las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1 de IBDV.

20 28. Empleo de cápsidas vacías completas del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs completas de IBDV], según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, en la elaboración de un medicamento.

25 29. Empleo según la reivindicación 28, en el que dicho medicamento es una vacuna frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.

30 30. Empleo según la reivindicación 28, en el que dicho medicamento es un vector para terapia génica.

30 31. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías completas de IBDV [VLPs completas de IBDV], según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

32. Vacuna según la reivindicación 31, para proteger aves de la infección causada por IBDV.

33. Vacuna según la reivindicación 32, en la que dichas aves se seleccionan del grupo 5 formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces.

34. Una vacuna para proteger pollos de la infección causada por el virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías completas de IBDV, VLPs completas de IBDV, según cualquiera de las 10 reivindicaciones 26 ó 27, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

35. Un procedimiento para la obtención de un baculovirus recombinante dual que permite la expresión simultánea en células de insecto de la poliproteína del virus inductor de 15 la bursitis infecciosa (IBDV) y de la proteína VP1 de IBDV a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas, cada una de ellas, por un promotor de baculovirus diferente, que comprende:

a) construir un plásmido portador de una construcción génica que contiene (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de un baculovirus, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de un baculovirus, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus;

b) obtener un bácmido recombinante, que permite la expresión de forma simultánea durante su ciclo replicativo de la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dichos promotores de baculovirus, mediante la transformación de bacterias competentes con el plásmido obtenido en a); y

c) obtener un baculovirus recombinante dual, que permite la expresión simultánea de las

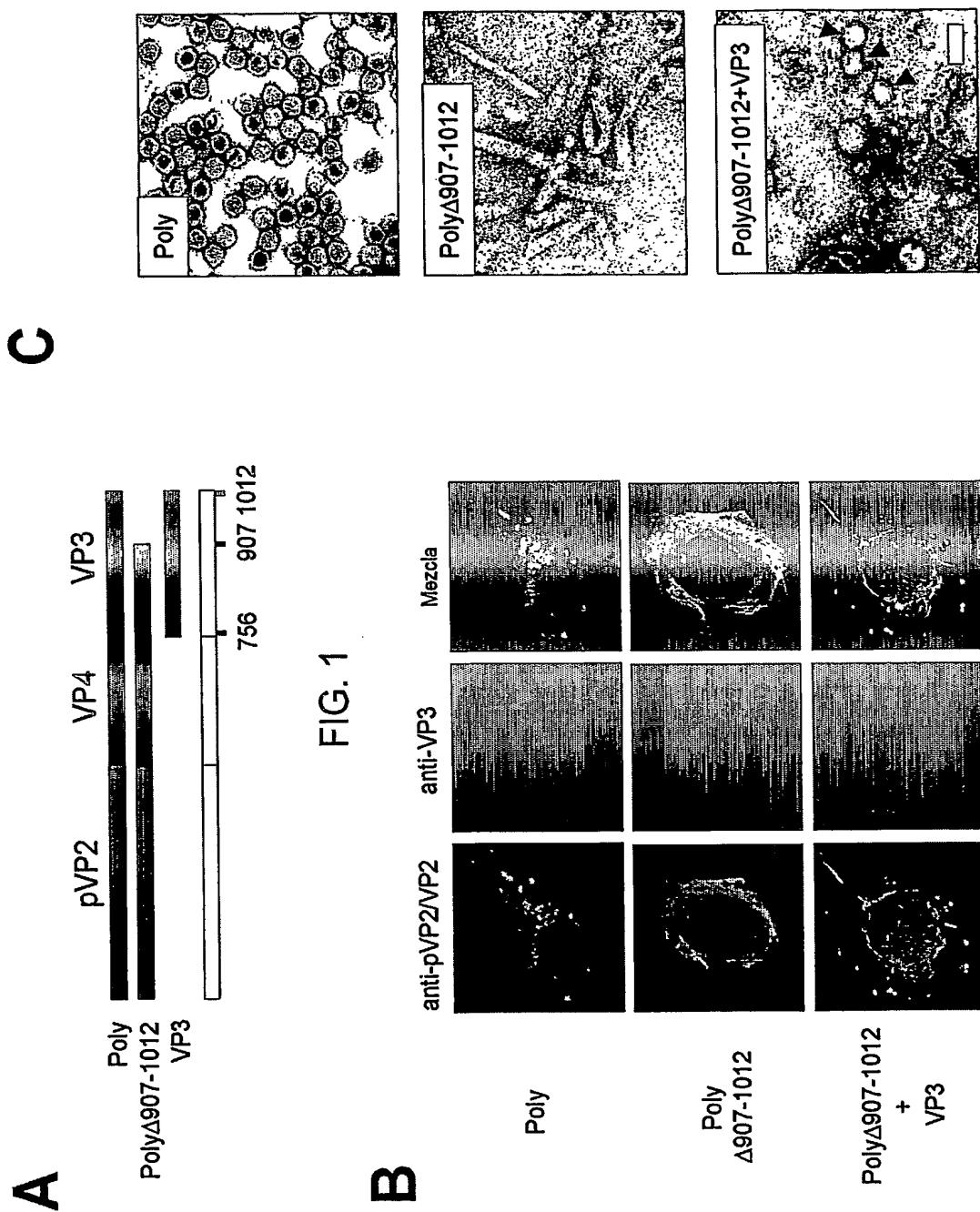
fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dichos promotores de baculovirus, mediante transformación de células de insecto con el bácmido recombinante de b).

5 36. Procedimiento según la reivindicación 35, en el que:

- dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la proteína p10 de AcMNV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV, o viceversa;
- el plásmido obtenido en a) es el identificado como pFBD/Poly-VP1;
- las bacterias competentes de b) son *E. coli* DH10Bac;
- el bácmido recombinante obtenido en b) es el identificado como Bac/pFBD/Poly-VP1; y
- el baculovirus recombinante obtenido es el identificado como FBD/Poly-VP1.

10 20 37. Procedimiento según la reivindicación 35 ó 36, que comprende, además, la infección de células de insecto con el baculovirus recombinante dual obtenido en la etapa c).

15 38. Procedimiento según la reivindicación 37, en el que dichas células de insecto son células H5 o de *Spodoptera frugiperda* Sf9.



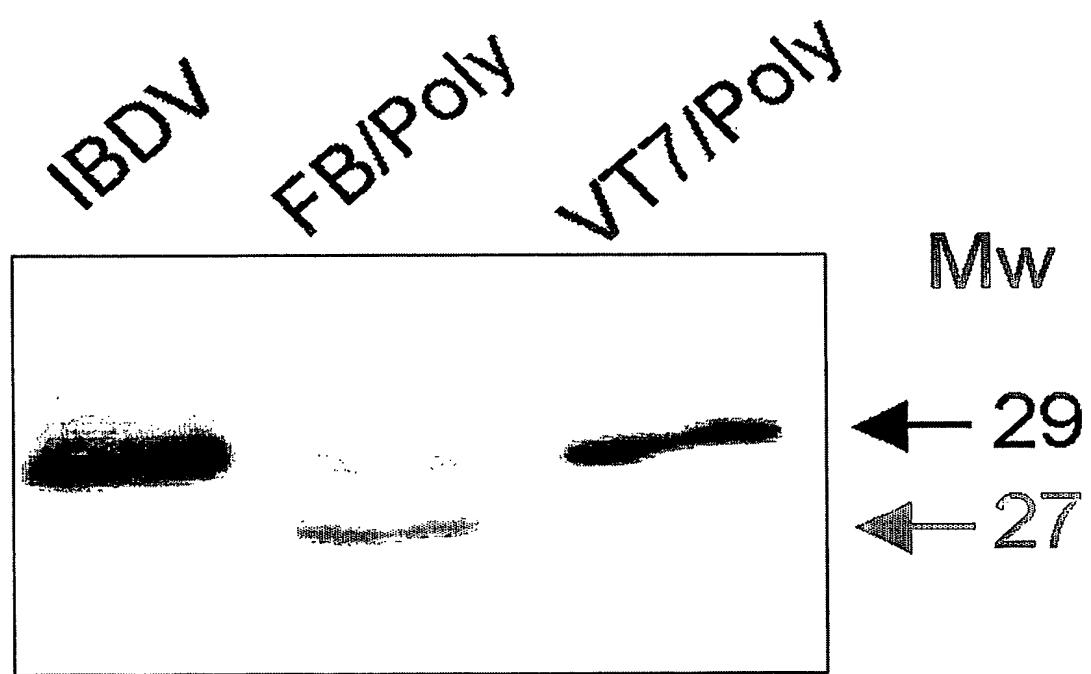


FIG. 2

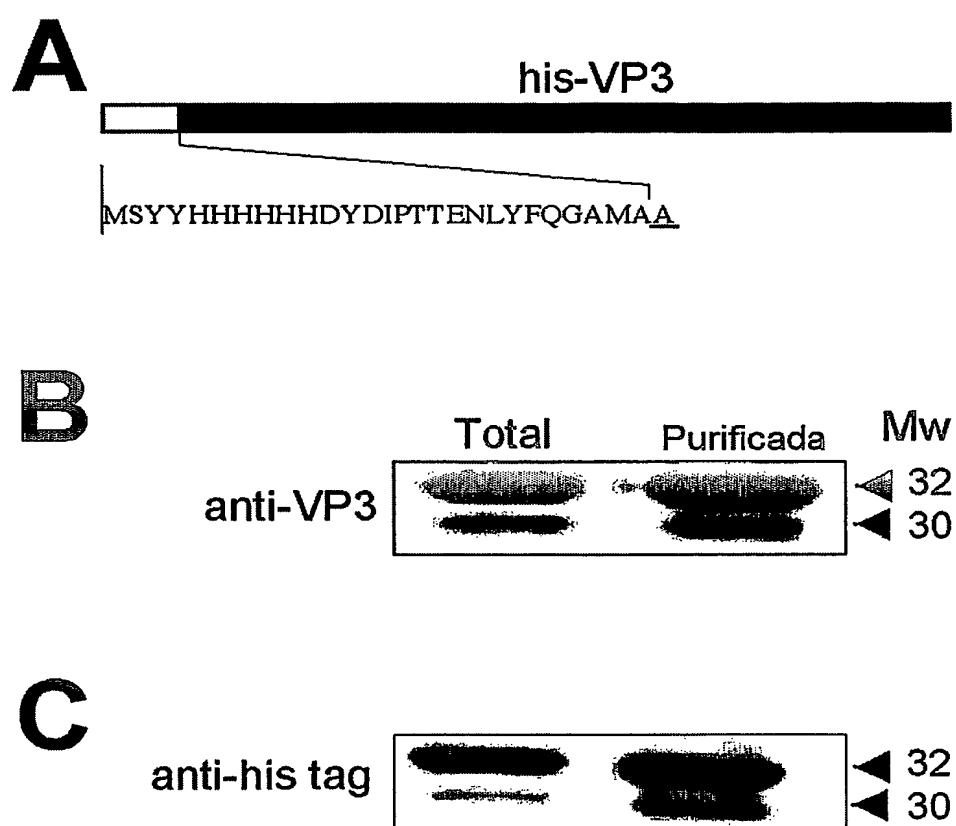


FIG. 3

A

| | | 222 | 257 |
|-----------------|---------|--------------------------------------|-----|
| his-VP3 wt | his-VP3 | PRRALPKPKPKPNAPTQRPPGRLGRWIRTVSDEDLE | |
| his-VP3Δ253-257 | his-VP3 | PRRALPKPKPKPNAPTQRPPGRLGRWIRTVS | |
| his-VP3Δ248-257 | his-VP3 | PRRALPKPKPKPNAPTQRPPGRLGRW | |
| his-VP3Δ243-257 | his-VP3 | PRRALPKPKPKPNAPTQRPPG | |
| his-VP3Δ238-257 | his-VP3 | PRRALPKPKPKPNAPT | |
| his-VP3Δ233-257 | his-VP3 | PRRALPKPKPK | |
| his-VP3Δ228-257 | his-VP3 | PRRALP | |

B

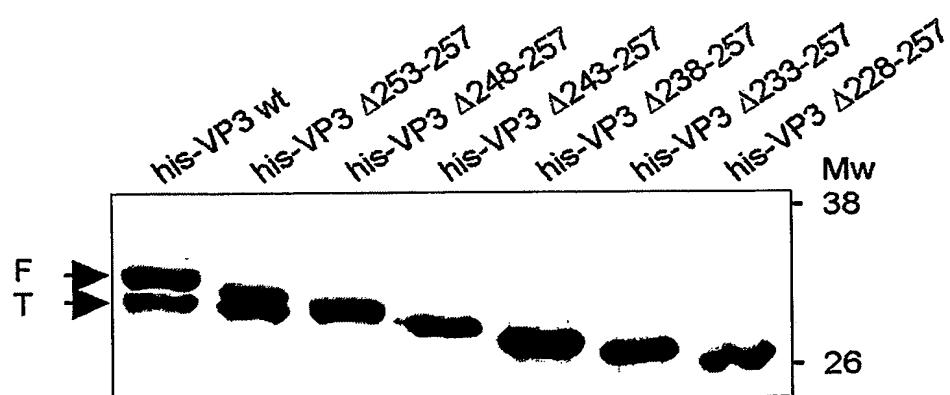


FIG. 4

5/9

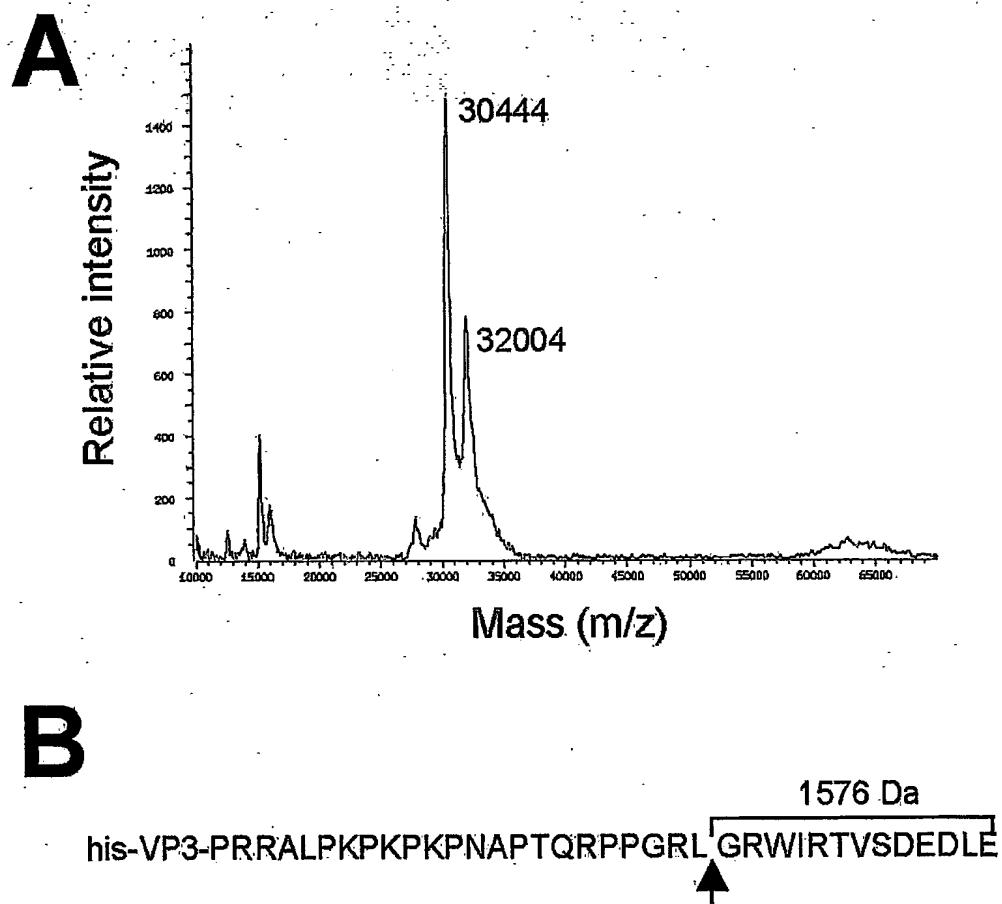


FIG. 5

6/9

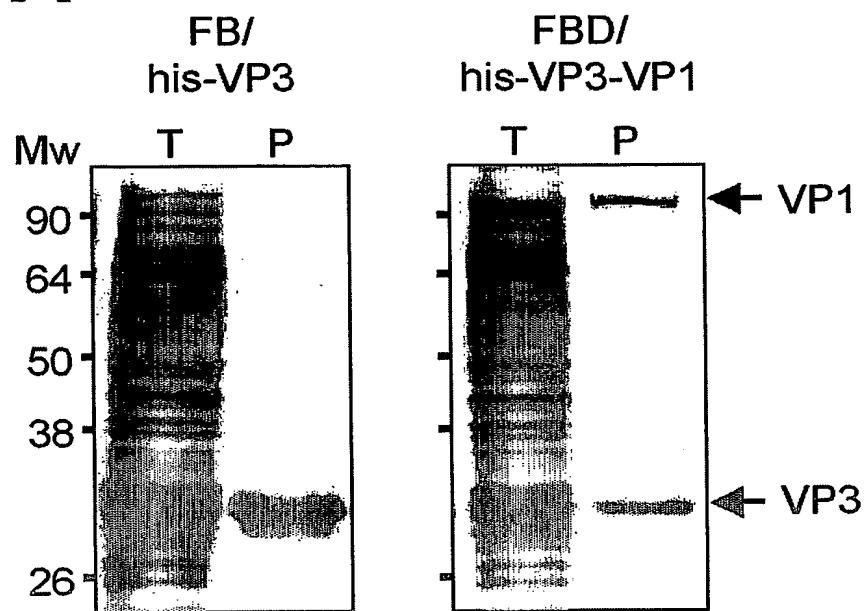
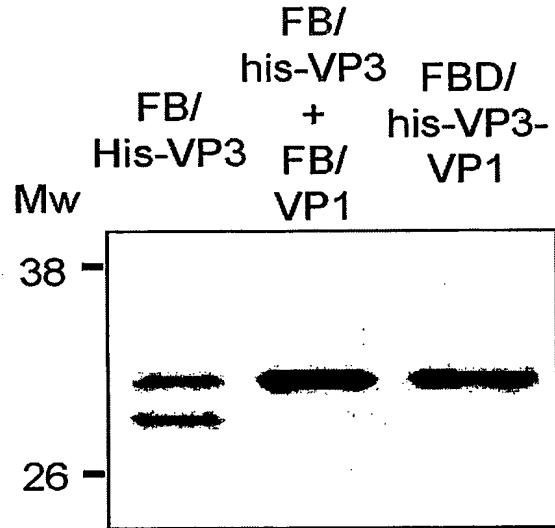
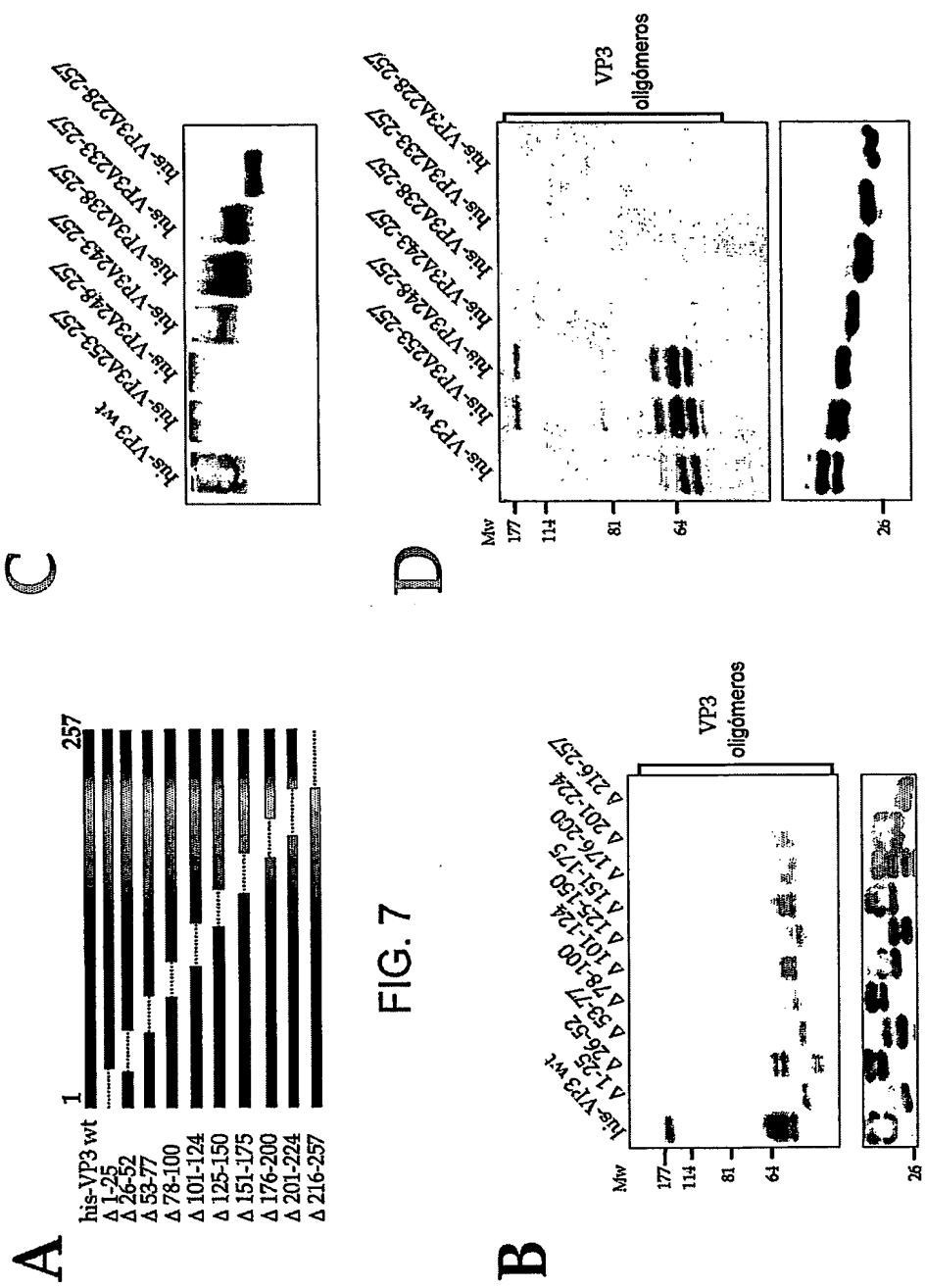
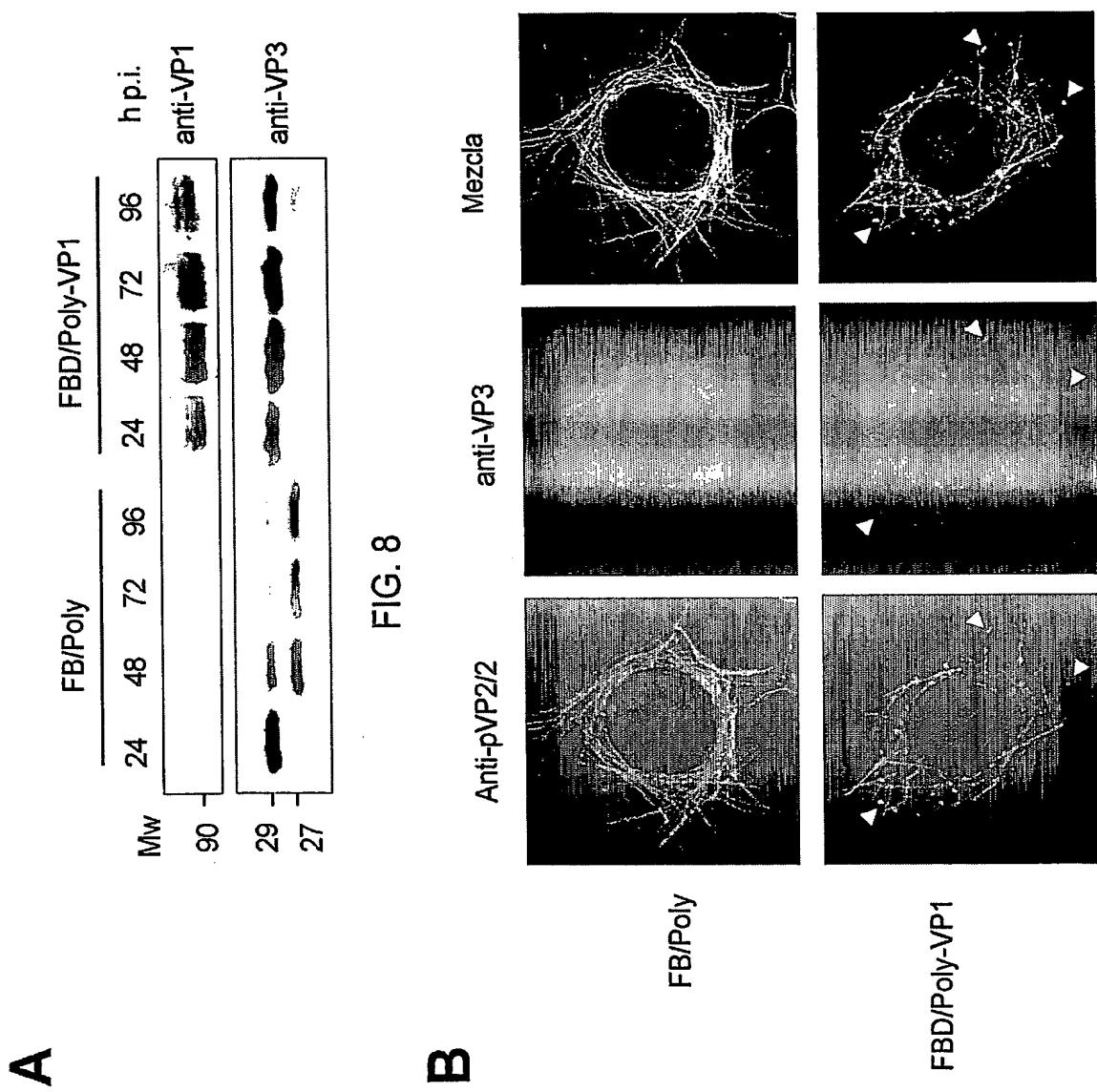
A**B**

FIG. 6





9/9

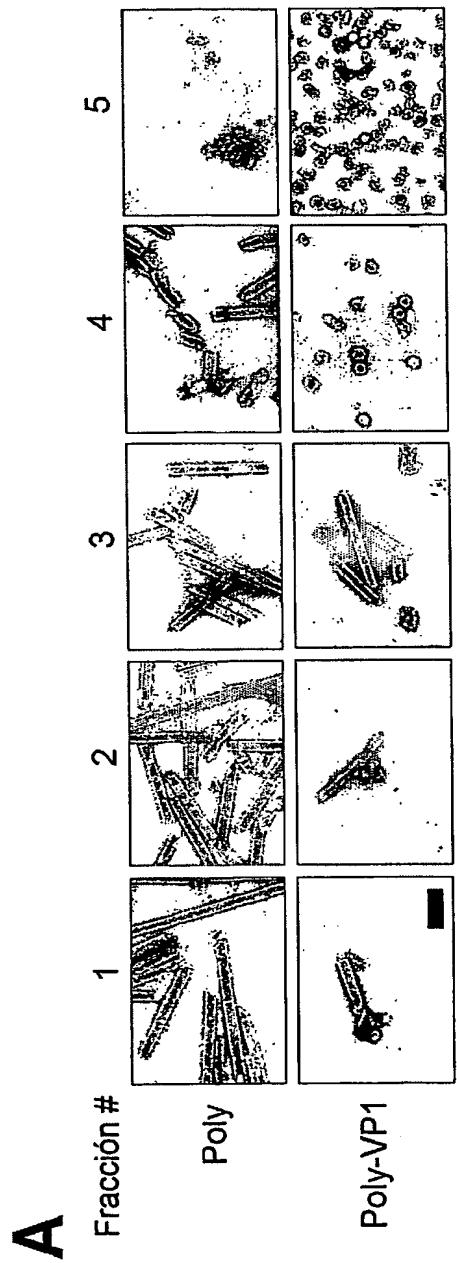
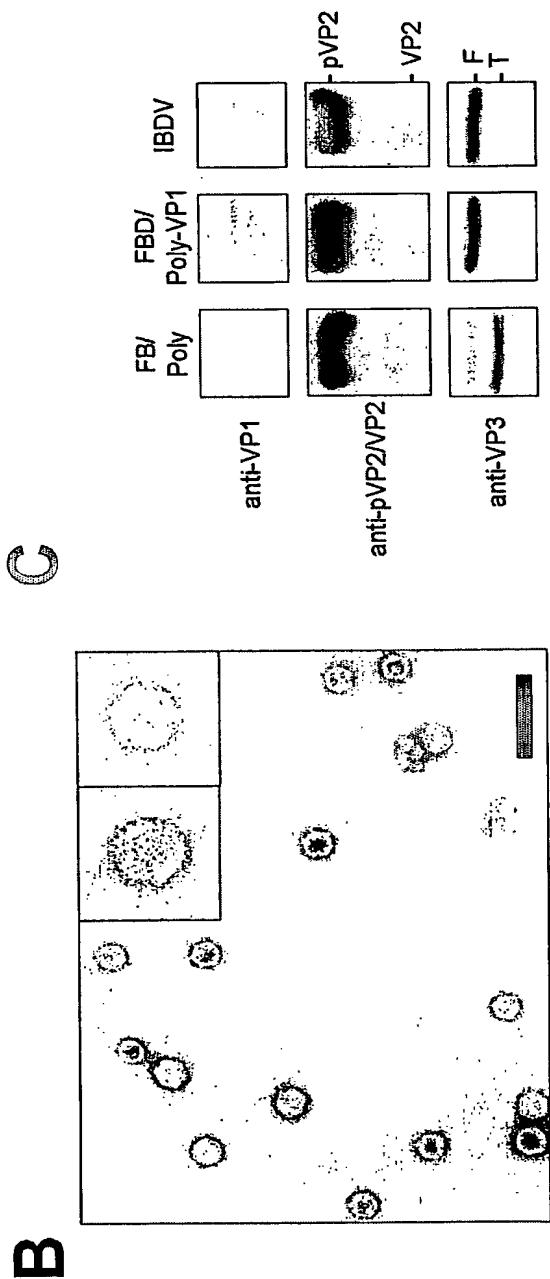


FIG. 9



LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
<110> BIONOSTRA, S.L.

<120> PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS COMPLETAS DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), PROCEDIMIENTO PARA SU PRODUCCIÓN Y APLICACIONES

<150> P200300751
<151> 2003-03-31

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 10909
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV

<220>
<221> gen
<222> (3)..(3041)
<223> Fase de Lectura Abierta de la Poliproteína de IBDV en cadena complementaria reversa

<220>
<221> promotor
<222> (3083)..(3211)
<223> Promotor de poliedrina de AcMNV

<220>
<221> promotor
<222> (3230)..(3351)
<223> Promotor p10 de AcMNV

<220>
<221> CDS
<222> (3388)..(6027)
<223> Fase de Lectura Abierta de la proteína VP1 de IBDV

<220>
<221> polyA_site
<222> (6068)..(6331)
<223>

<220>
<221> gen
<222> (6901)..(7434)
<223> Gen de resistencia a Gentamicina

<220>
<221> misc_feature
<222> (7501)..(7725)
<223> Minitransposon Tn7R

```

<220>
<221>  gen
<222>  (8787)..(9647)
<223>  Gen de resistencia a Ampicilina

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (9854)..(10234)
<223>  F1

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (10418)..(10583)
<223>  Minitransponon Tn7L

<400>  1
gctcaactaa ggtcctcatc agagacggtc ctgatccagc ggcccagccg accagggggt      60
ctctgtgttg gaggattggg ttttggcttg ggctttggta gagcccgctt gggattgcga      120
tgcttcatct ccatcgcagt caagagcaga tctttcatct gttcttgggt tggccacgt      180
ccatggttga tttcatagac tttggcaact tcgtctatga aagcttgggg tggctctgcc      240
tgtcctggag ccccgtagat cgacgttagt gccccttagga tttgttcttc tgatgccaac      300
cggtctttct ctgcacatgcac gtatgttaga tagtcctcgt ttgggtccgg tatttctcgt      360
ttgttctgcc agtactttac ctggcctggg cttggccctc ggtgcccatt gagtgctacc      420
cattctggtg ttgcaaagta gatgcccatg gtctccatct tctttgagat ccgtgtgtct      480
ttttccctct gtgcttcctc tgggtgtggg ccccgagcct ccactccgtt gcctgctgtc      540
ccgtacttgg ccctttgcga cttgctgcct gcttgtggtg cgtttgcagaaaatttcgc      600
atccgatggg cgttcgggtc gctgagtgcg aagttggcca tgtcagtcac aatcccattc      660
tcttccagcc acatgaacac actgagtgca gattgaaata gtgggtccac gttggctgt      720
gcttccatgg ctctgacggc actctcgagt tcgggggtct ctttgaactc tgatgcagcc      780
atggcaaggt ggtactggcg tcctgcattt ggtggaaaggat atggtaggtt gaggttaggg      840
agcctgtccc agtcgcgtgg attgtgaggg aaacgtttga tgaacgttgc ccagttgggc      900
ccgggtttta catcgaatgc tccgggacca gccaacctaa ggccaagtcg gtgtgcagta      960
gcgagcttgg tgcttctaaa gcttactttc tcaatctcgc cacaagcattt gagggctccc      1020
gtcatagcca catggattgg gactttgggt cgaaacacat ccatgtaaac tatggctaga      1080
tttccactgt ttcccacaat aggaggtatg ggatctttgg acagcataat gctgtcgatcc      1140
cagacatcat ctattgggac aacgggttag tctctcccaag tctccagtgg aagtacccca      1200
tctggagcat atccatagac tctgtgtcca gagagagttc gtatgaagga tcctctttga      1260
gatggagggtt ggaggtcttc tcgcacgcct tcaatgacag caaacatttt gctgttcaat      1320
gctttgggtt tcatggcgat tcctactgtc gtaataacca cagggatag cgtggcaccc      1380

```

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| tctcttaaca | cgcagtcgag | gttgtgtca | ccgcggagta | ccccaggtga | agcaagaatc | 1440 |
| ccgtcgacta | cgggattctg | gggcacctgg | aatagattcg | cgactaccc | gtacccttg | 1500 |
| tcggcggcga | gagtca | cttatgcgg | cctgaggcag | ctcttgctt | tcctgacgcg | 1560 |
| gctcgagcag | ttcctgaagc | ggcctggcc | tcatcgccca | gcaggtagtc | tacaccttc | 1620 |
| ccaattgcat | gggctagggg | agcggcaggt | ggaaacaatg | tggagaccac | cggcacagct | 1680 |
| atcctcctta | tggcccgat | tatgtcttg | aagccgaatg | ctcctgcaat | cttcagggga | 1740 |
| gagttgaggt | cggccaccc | catgaagtat | tcacgaaagt | cagtgtactc | cttgttgc | 1800 |
| cagacggct | tgtatgccaag | acggccctc | tcactcagta | tcaattttgt | gtagttcatg | 1860 |
| gctcctgggt | caaatcgcc | gtattctgta | accaggtct | ttgctagttc | aggatttggg | 1920 |
| atcagctcg | agttgctcac | cccagcggacc | gtaacgacgg | atcctgttgc | cactcttcg | 1980 |
| taggccacta | gcgtgacggg | acggagggcc | cctggatagt | tgccaccatg | gatcgtcact | 2040 |
| gctaggctcc | ctcttgcga | ccatgacatc | tgatcccc | cctgaccacc | acttttggag | 2100 |
| gtcactatct | ccagtttgat | ggatgtgatt | ggctgggtta | tctcgtttgc | tggaatcaca | 2160 |
| agattgaatg | gcataagggtt | gtcggtgccg | gtcgtcagcc | cattgttgc | ggccacagcc | 2220 |
| ctggtgatta | ccgttgtccc | atcaaaggct | atgaggtaga | tggtggcc | cagtacaagg | 2280 |
| ccgtggacgc | ttgttcgaaa | cacgagctct | cccccaacgc | tgaggctgt | gatggcatca | 2340 |
| atgttggctg | agaacagtgt | gattgttacc | ccacctggtt | ggtactgtga | tgagaattgg | 2400 |
| taatcatcg | ctgcagttat | ggtgttagact | ctgggcctgt | caactgtgtc | acatgtggct | 2460 |
| accattttg | ggtcaagccc | tattgcggga | atggggtcac | caagcctcac | atacccaaga | 2520 |
| tcatatgatg | tggtaagct | gaggacggtg | acccttccc | ctactaggac | gttcccaatt | 2580 |
| ttgtcggtga | tgttggctgt | tgcagacatc | aaccattgt | agctaacatc | tgtcagttca | 2640 |
| ctcaggcttc | cttggaaagg | cacggcg | atgggtccgt | ttagtgcata | aacgccacca | 2700 |
| ggaagtgtgc | ttgacctcac | tgtgagactc | cgactca | gcctgcagta | gttgtaactg | 2760 |
| gccggtaggt | tctggccagt | caggagcatc | tgatcgaact | tgtagttccc | attgcctgc | 2820 |
| agtgtgttgt | gagcacccac | aattgagcca | ggaaatccag | ggaaaaagac | aattagccct | 2880 |
| gaccctgtgt | ccccacagt | caaattgtag | gtcgaggct | ctgacccatg | agtgtgc | 2940 |
| tccagggtgt | cgtccggaa | ggacgcccgt | ccgggttgtt | gcatcagaag | gtccgtatg | 3000 |
| aacgaaacaa | tctgctgggt | ttgatctgac | agtttgtca | tcgatgcgt | cgaattccgc | 3060 |
| gcgcttcgga | ccggatccg | cgcgcgttgg | tggacggta | tgaataatcc | ggaatattta | 3120 |
| tagttttt | tattacaaaa | ctgttacgaa | aacagtaaaa | tacttattta | tttgcgagat | 3180 |

4

ggttatcatt ttaattatct ccatgatcta ttaatattcc ggagtatacg gaccttaat 3240
 tcaacccaac acaatatatt atagttaaat aagaattatt atcaaatcat ttgtatatta 3300
 attaaaatac tatactgtaa attacatttt atttacaatc actcgacgaa gacttgatca 3360
 cccggatct cgaggtcgac ggtatcg atg agt gac gtt ttc aat agt cca cag 3414
 Met Ser Asp Val Phe Asn Ser Pro Gln
 1 5

gcg cga agc acg atc tca gca gcg ttc ggc ata aag cct act gct gga 3462
 Ala Arg Ser Thr Ile Ser Ala Ala Phe Gly Ile Lys Pro Thr Ala Gly
 10 15 20 25

caa gac gtg gaa gaa ctc ttg atc cct aaa gtt tgg gtg cca cct gag 3510
 Gln Asp Val Glu Glu Leu Leu Ile Pro Lys Val Trp Val Pro Pro Glu
 30 35 40

gat ccg ctt gcc agc cct agt cga ctg gca aag ttc ctc aga gag aac 3558
 Asp Pro Leu Ala Ser Pro Ser Arg Leu Ala Lys Phe Leu Arg Glu Asn
 45 50 55

ggc tac aaa gtt ttg cag ccg cgg tct ctg ccc gag aat gag gag tat 3606
 Gly Tyr Lys Val Leu Gln Pro Arg Ser Leu Pro Glu Asn Glu Glu Tyr
 60 65 70

gag acc gac caa ata ctc cca gac tta gca tgg atg cga cag ata gaa 3654
 Glu Thr Asp Gln Ile Leu Pro Asp Leu Ala Trp Met Arg Gln Ile Glu
 75 80 85

ggg gct gtt tta aaa ccc act cta tct ctc cct att gga gat cag gag 3702
 Gly Ala Val Leu Lys Pro Thr Leu Ser Leu Pro Ile Gly Asp Gln Glu
 90 95 100 105

tac ttc cca aag tac tac cca aca cat cgc cct agc aag gag aag ccc 3750
 Tyr Phe Pro Lys Tyr Tyr Pro Thr His Arg Pro Ser Lys Glu Lys Pro
 110 115 120

aat gcg tac cca cca gac atc gca cta ctc aag cag atg att tac ctg 3798
 Asn Ala Tyr Pro Pro Asp Ile Ala Leu Leu Lys Gln Met Ile Tyr Leu
 125 130 135

ttt ctc cag gtt cca gag gcc aac gag ggc cta aag gat gaa gta acc 3846
 Phe Leu Gln Val Pro Glu Ala Asn Glu Gly Leu Lys Asp Glu Val Thr
 140 145 150

ctc ttg acc caa aac ata agg gac aag gcc tat gga agt ggg acc tac 3894
 Leu Leu Thr Gln Asn Ile Arg Asp Lys Ala Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr
 155 160 165

atg gga caa gca aat cga ctt gtg gcc atg aag gag gtc gcc act gga 3942
 Met Gly Gln Ala Asn Arg Leu Val Ala Met Lys Glu Val Ala Thr Gly
 170 175 180 185

aga aac cca aac aag gat cct cta aag ctt ggg tac act ttt gag agc 3990
 Arg Asn Pro Asn Lys Asp Pro Leu Lys Leu Gly Tyr Thr Phe Glu Ser
 190 195 200

atc gcg cag cta ctt gac atc aca cta ccg gta ggc cca ccc ggt gag 4038
 Ile Ala Gln Leu Leu Asp Ile Thr Leu Pro Val Gly Pro Pro Gly Glu
 205 210 215

| | | | |
|---|-----|------|-----|
| gat gac aag ccc tgg gtg cca ctc aca aga gtg ccg tca cg ^g atg ttg | | 4086 | |
| Asp Asp Lys Pro Trp Val Pro Leu Thr Arg Val Pro Ser Arg Met Leu | | | |
| 220 | 225 | 230 | |
| gtg ctg acg gga gac gta gat ggc gac ttt gag gtt gaa gat tac ctt | | 4134 | |
| Val Leu Thr Gly Asp Val Asp Gly Asp Phe Glu Val Glu Asp Tyr Leu | | | |
| 235 | 240 | 245 | |
| ccc aaa atc aac ctc aag tca tca agt gga cta cca tat gta ggt cgc | | 4182 | |
| Pro Lys Ile Asn Leu Lys Ser Ser Ser Gly Leu Pro Tyr Val Gly Arg | | | |
| 250 | 255 | 260 | 265 |
| acc aaa gga gag aca att ggc gag atg ata gct ata tca aac cag ttt | | 4230 | |
| Thr Lys Gly Glu Thr Ile Gly Glu Met Ile Ala Ile Ser Asn Gln Phe | | | |
| 270 | 275 | 280 | |
| ctc aga gag cta tca aca ctg ttg aag caa ggt gca ggg aca aag ggg | | 4278 | |
| Leu Arg Glu Leu Ser Thr Leu Leu Lys Gln Gly Ala Gly Thr Lys Gly | | | |
| 285 | 290 | 295 | |
| tca aac aag aag cta ctc agc atg tta agt gac tat tgg tac tta | | 4326 | |
| Ser Asn Lys Lys Leu Ser Met Leu Ser Asp Tyr Trp Tyr Leu | | | |
| 300 | 305 | 310 | |
| tca tgc ggg ctt ttg ttt cca aag gct gaa agg tac gac aaa agt aca | | 4374 | |
| Ser Cys Gly Leu Leu Phe Pro Lys Ala Glu Arg Tyr Asp Lys Ser Thr | | | |
| 315 | 320 | 325 | |
| tgg ctc acc aag acc cgg aac ata tgg tca gct cca tcc cca aca cac | | 4422 | |
| Trp Leu Thr Lys Thr Arg Asn Ile Trp Ser Ala Pro Ser Pro Thr His | | | |
| 330 | 335 | 340 | 345 |
| ctc atg atc tcc atg atc acc tgg ccc gtg atg tcc aac agc cca aat | | 4470 | |
| Leu Met Ile Ser Met Ile Thr Trp Pro Val Met Ser Asn Ser Pro Asn | | | |
| 350 | 355 | 360 | |
| aac gtg ttg aac att gaa ggg tgg cca tca ctc tac aaa ttc aac ccg | | 4518 | |
| Asn Val Leu Asn Ile Glu Gly Cys Pro Ser Leu Tyr Lys Phe Asn Pro | | | |
| 365 | 370 | 375 | |
| ttc aga gga ggg ttg aac agg atc gtc gag tgg ata ttg gcc ccg gaa | | 4566 | |
| Phe Arg Gly Gly Leu Asn Arg Ile Val Glu Trp Ile Leu Ala Pro Glu | | | |
| 380 | 385 | 390 | |
| gaa ccc aag gct ctt gta tat gcg gac aac ata tac att gtc cac tca | | 4614 | |
| Glu Pro Lys Ala Leu Val Tyr Ala Asp Asn Ile Tyr Ile Val His Ser | | | |
| 395 | 400 | 405 | |
| aac acg tgg tac tca att gac cta gag aag ggt gag gca aac tgc act | | 4662 | |
| Asn Thr Trp Tyr Ser Ile Asp Leu Glu Lys Gly Glu Ala Asn Cys Thr | | | |
| 410 | 415 | 420 | 425 |
| cgc caa cac atg caa gcc gca atg tac tac ata ctc acc aga ggg tgg | | 4710 | |
| Arg Gln His Met Gln Ala Ala Met Tyr Tyr Ile Leu Thr Arg Gly Trp | | | |
| 430 | 435 | 440 | |
| tca gac aac ggc gac cca atg ttc aat caa aca tgg gcc acc ttt gcc | | 4758 | |
| Ser Asp Asn Gly Asp Pro Met Phe Asn Gln Thr Trp Ala Thr Phe Ala | | | |
| 445 | 450 | 455 | |

| | |
|---|------|
| atg aac att gcc cct gct cta gtg gtg gac tca tcg tgc ctg ata atg Met Asn Ile Ala Pro Ala Leu Val Val Asp Ser Ser Cys Leu Ile Met 460 465 470 | 4806 |
| aac ctg caa att aag acc tat ggt caa ggc agc ggg aat gca gcc acg Asn Leu Gln Ile Lys Thr Tyr Gly Gln Gly Ser Gly Asn Ala Ala Thr 475 480 485 | 4854 |
| ttc atc aac aac cac ctc ttg agc acg cta gtg ctt gac cag tgg aac Phe Ile Asn Asn His Leu Leu Ser Thr Leu Val Leu Asp Gln Trp Asn 490 495 500 505 | 4902 |
| ttg atg aga cag ccc aga cca gac agc gag gag ttc aaa tca att gag Leu Met Arg Gln Pro Arg Pro Asp Ser Glu Glu Phe Lys Ser Ile Glu 510 515 520 | 4950 |
| gac aag cta ggt atc aac ttt aag att gag agg tcc att gat gat atc Asp Lys Leu Gly Ile Asn Phe Lys Ile Glu Arg Ser Ile Asp Asp Ile 525 530 535 | 4998 |
| agg ggc aag ctg aga cag ctt gtc ctc ctt gca caa cca ggg tac ctg Arg Gly Lys Leu Arg Gln Leu Val Leu Leu Ala Gln Pro Gly Tyr Leu 540 545 550 | 5046 |
| agt ggg ggg gtt gaa cca gaa caa tcc agc cca act gtt gag ctt gac Ser Gly Gly Val Glu Pro Glu Gln Ser Ser Pro Thr Val Glu Leu Asp 555 560 565 | 5094 |
| cta cta ggg tgg tca gct aca tac agc aaa gat ctc ggg atc tat gtg Leu Leu Gly Trp Ser Ala Thr Tyr Ser Lys Asp Leu Gly Ile Tyr Val 570 575 580 585 | 5142 |
| ccg gtg ctt gac aag gaa cgc cta ttt tgt tct gct gcg tat ccc aag Pro Val Leu Asp Lys Glu Arg Leu Phe Cys Ser Ala Ala Tyr Pro Lys 590 595 600 | 5190 |
| gga gta gag aac aag agt ctc aag tcc aaa gtc ggg atc gag cag gca Gly Val Glu Asn Lys Ser Leu Lys Ser Lys Val Gly Ile Glu Gln Ala 605 610 615 | 5238 |
| tac aag gta gtc agg tat gag gcg tta agg ttg gta ggt ggt tgg aac Tyr Lys Val Val Arg Tyr Glu Ala Leu Arg Leu Val Gly Gly Trp Asn 620 625 630 | 5286 |
| tac cca ctc ctg aac aaa gcc tgc aag aat aac gca ggc gcc gct cgg Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Ala Cys Lys Asn Asn Ala Gly Ala Ala Arg 635 640 645 | 5334 |
| cgg cat ctg gag gcc aag ggg ttc cca ctc gac gag ttc cta gcc gag Arg His Leu Glu Ala Lys Gly Phe Pro Leu Asp Glu Phe Leu Ala Glu 650 655 660 665 | 5382 |
| tgg tct gag ctg tca gag ttc ggt gag gcc ttc gaa ggc ttc aat atc Trp Ser Glu Leu Ser Glu Phe Gly Glu Ala Phe Glu Gly Phe Asn Ile 670 675 680 | 5430 |
| aag ctg acc gta aca tct gag agc cta gcc gaa ctg aac aag cca gta Lys Leu Thr Val Thr Ser Glu Ser Leu Ala Glu Leu Asn Lys Pro Val 685 690 695 | 5478 |

ccc ccc aag ccc cca aat gtc aac aga cca gtc aac act ggg gga ctc 5526
 Pro Pro Lys Pro Pro Asn Val Asn Arg Pro Val Asn Thr Gly Gly Leu
 700 705 710

 aag gca gtc agc aac gcc ctc aag acc ggt cggt tac agg aac gaa gcc 5574
 Lys Ala Val Ser Asn Ala Leu Lys Thr Gly Arg Tyr Arg Asn Glu Ala
 715 720 725

 gga ctg agt ggt ctc gtc ctt cta gcc aca gca aga agc cgt ctg cca 5622
 Gly Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Ala Arg Ser Arg Leu Gln
 730 735 740 745

 gat gca gtt aag gcc aag gca gaa gcc gag aaa ctc cac aag tcc aag 5670
 Asp Ala Val Lys Ala Lys Ala Glu Ala Glu Lys Leu His Lys Ser Lys
 750 755 760

 cca gac gac ccc gat gca gac tgg ttc gaa aga tca gaa act ctg tca 5718
 Pro Asp Asp Pro Asp Ala Asp Trp Phe Glu Arg Ser Glu Thr Leu Ser
 765 770 775

 gac ctt ctg gag aaa gcc gac atc gcc agc aag gtc gcc cac tca gca 5766
 Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asp Ile Ala Ser Lys Val Ala His Ser Ala
 780 785 790

 ctc gtg gaa aca agc gac gcc ctt gaa gca gtt cag tcg act tcc gtg 5814
 Leu Val Glu Thr Ser Asp Ala Leu Glu Ala Val Gln Ser Thr Ser Val
 795 800 805

 tac acc ccc aag tac cca gaa gtc aag aac cca cag acc gcc tcc aac 5862
 Tyr Thr Pro Lys Tyr Pro Glu Val Lys Asn Pro Gln Thr Ala Ser Asn
 810 815 820 825

 ccg gtt gtt ggg ctc cac ctg ccc gcc aag agg gcc acc ggt gtc cag 5910
 Pro Val Val Gly Leu His Leu Pro Ala Lys Arg Ala Thr Gly Val Gln
 830 835 840

 gcc gct ctt ctc gga gca gga acg agc aga cca atg ggg atg gag gcc 5958
 Ala Ala Leu Leu Gly Ala Gly Thr Ser Arg Pro Met Gly Met Glu Ala
 845 850 855

 cca aca cgg tcc aag aac gcc gtg aaa atg gcc aaa cgg cgg caa cgc 6006
 Pro Thr Arg Ser Lys Asn Ala Val Lys Met Ala Lys Arg Arg Gln Arg
 860 865 870

 caa aag gag agc cgc caa tag ccatgaggcg gccctgatgc atagcatgcg 6057
 Gln Lys Glu Ser Arg Gln
 875

 gtaccgggag atgggggagg ctaactgaaa cacggaagga gacaataccg gaaggaaccc 6117
 gcgctatgac ggcaataaaa agacagaata aaacgcacgg gtgttgggtc gtttgttcat 6177
 aaacgcgggg ttcggtccca gggctggcac tctgtcgata ccccacccgag accccattgg 6237
 gaccaatacg cccgcgttcc ttccctttcc ccaccccaac ccccaagttc gggtaaggc 6297
 ccagggctcg cagccaacgt cggggcggca agccctgcca tagccactac gggtaacgtag 6357
 gccaaccact agaactatacg ctagagtccct gggcgaacaa acgatgtcg ccttccagaa 6417

aaccgaggat gcgaaccact tcatccgggg tcagcaccac cggcaagcgc cgcgacggcc 6477
 gaggtctacc gatctcctga agccaggca gatccgtca cagcaccttgcgtcc 6537
 acagcaaggc cgccaaatgcc tgacgatgcg tggagaccga aaccttgcgc tcgttcgc 6597
 gccaggacag aaatgcctcg acttcgctgc tgcccaaggt tgccgggtga cgcacaccgt 6657
 ggaaacggat gaaggcacga acccagttga cataagcctg ttcgggtcgtaaactgtat 6717
 gcaagtagcg tatgcgctca cgcaactggtt ccagaacctt gaccgaacgc agcgggtggta 6777
 acggcgcagt ggcgggtttc atggcttgcgtt atgactgttt tttgtacag tctatgcctc 6837
 gggcatccaa gcagcaagcg cggtacgccc tgggtcgatgttgcgttgcgttgcgtt 6897
 acgatgttac gcagcagcaa cgatgttacg cagcaggca gtcgcctaa aacaaagtta 6957
 ggtggctcaa gtatggcat cattcgacata tgggtcgatgttgcgttgcgttgcgtt 7017
 atgcgggctg ctcttgatct tttcggtcgatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 7077
 catcagccgg actccgattt cctcggaac ttgctccgtatgttgcgttgcgttgcgtt 7137
 gtcgccttcg accaagaagc ggttggc gctctcgccg cttacgttgcgttgcgttgcgtt 7197
 gagcagccgc gtagtgagat ctatatctat gatctcgacatgttgcgttgcgttgcgtt 7257
 cagggcattt ccaccgcgtt catcaatctc ctcaaggatgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 7317
 tatgtgatct acgtgcaagc agattacggt gacgatcccg cagtggtcttgcgttgcgtt 7377
 ttgggcatac gggagaagttt gatatcgacc caagtaccgc cacctaaca 7437
 ttcgttcaag ccgagatcggtt cttccggcc gggagttgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 7497
 cgcgaatata gtctttacca tgcccttggc cacgcccctc tttaatacgacggcaattt 7557
 gcacttcaga aaatgaagat tttgttttag ccataacaaa agtccagtat gctttttcac 7617
 agcataactg gactgatttcaac agtttacaac tattctgtct agtttaagac tttattgtca 7677
 tagtttagat ctatttgtt cagtttacca ctttattgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 7737
 gggcatccat ttattactca accgtaaccg attttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 7797
 tgtgaaatac cgcacagatg cgttggaga aaataccgca tcaggcgctc ttccgcttcc 7857
 tcgctcactg actcgctgcg ctcgggtcgatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 7917
 aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca gggataacg cagggaaagaa catgtgagca 7977
 aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt tttccatagg 8037
 ctccggccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaaa gtcagagggttgcgttgcgtt 8097
 acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaaagct ccctcgatgcgttgcgttgcgtt 8157
 ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gccttctcc ctccggaaag cgtggcggttgcgtt 8217
 tctcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 8277

tgggtgcacg aaccccccgt tcagcccac cgctgcgcct tatccgtaa ctatcgctt 8337
 gagtccaacc cggttaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt 8397
 agcagagcga ggtatgttagg cggtgctaca gagttcttga agtggtgcc taactacggc 8457
 tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcgaaaaa 8517
 agagttggta gctcttgcac cgccaaacaa accaccgctg gtacgggtgg tttttttgtt 8577
 tgcaagcagc agattacgac cagaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt gatctttct 8637
 acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggc catgagatta 8697
 tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa 8757
 agtataatag agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 8817
 tcagcgatct gtctatttcg ttcatccata gttgcctgac tccccgtcggt gtagataact 8877
 acgatacggg agggcttacc atctggccccc agtgctgaa tgataccgac agacccacgc 8937
 tcaccggctc cagatttatac agcaataaac cagccagccg gaaggccga ggcagaagt 8997
 ggtcctgcaa ctatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta 9057
 agtagttcgc cagtaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcggttg 9117
 tcacgctcggt cgtttggat ggcttcattc agctccgggtt cccaaacgatc aaggcgagg 9177
 acatgatccc ccatgttgcg caaaaaaagcg gttagctcct tcggcctcc gatcggttgc 9237
 agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattcttt 9297
 actgtcatgc catccgtaaat atgctttct gtgactgggt agtactcaac caagtcatc 9357
 tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcggcg cgtcaatacg ggataatacc 9417
 ggcacata gcagaacttt aaaagtgcac atcattggaa aacgttcttc gggcgaaaaa 9477
 ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aacccactcg tgcacccaaac 9537
 tgatcttcag catctttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa 9597
 aatgccgcaa aaaagggaaat aaggcgaca cggaaatgtt gaataactcat actcttcctt 9657
 tttcaatatt attgaagcat ttatcagggat tattgtctca tgagccgata catattgaa 9717
 tgtatTTAGA AAAATAAACAA AATAGGGGTT CCAGCAGACAT TTCCCCGAAA AGTGCACCT 9777
 gaaattgtaa acgttaatat tttgttaaaa ttccgcgttaa attttggta aatcagctca 9837
 ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 9897
 atagggttga gtgttggcc agttggaaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc 9957
 aacgtcaaag ggcggaaaaac cgtctatcg ggcgtggcc cactacgtga accatcaccc 10017
 taatcaagtt ttttgggttc gaggtggcgt aaagcactaa atcggaaaccc taaagggagc 10077
 ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcaacgtgg cgagaaagga agggaaagaaa 10137

10

gcgaaaaggag cggcgctag ggcgctggca agtgttagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 10197
 acacccgccc cgcttaatgc gccgctacag ggccggtccc attcgccatt caggctgcaa 10257
 ataagcgttg atattcagtc aattacaaac attaataacg aagagatgac agaaaaattt 10317
 tcattctgtg acagagaaaa agtagccgaa gatgacggtt tgtcacatgg agttggcagg 10377
 atgtttgatt aaaaacataa caggaagaaa aatgccccgc tgtggcgga caaaatagtt 10437
 gggactggg aggggtggaa atggagttt taaggattat ttaggagaaga gtgacaaaat 10497
 agatggaaac tgggtgtagc gtcgtaagct aatacgaaaa ttaaaaatga caaaatagtt 10557
 tggaaactaga tttcacttat ctggttcgga tctccttaggc tcaagcagtg atcagatcca 10617
 gacatgataa gatacattga tgagtttggaa caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa 10677
 tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat 10737
 aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg 10797
 gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta tggctgatta tgatcctcta 10857
 gtacttctcg acaagcttgt cgagactgca ggctctagat tcgaaagcgg cc 10909

<210> 2

<211> 879

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína VP1 de IBDV

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Asp | Val | Phe | Asn | Ser | Pro | Gln | Ala | Arg | Ser | Thr | Ile | Ser | Ala |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 15 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Phe | Gly | Ile | Lys | Pro | Thr | Ala | Gly | Gln | Asp | Val | Glu | Glu | Leu | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Pro | Lys | Val | Trp | Val | Pro | Pro | Glu | Asp | Pro | Leu | Ala | Ser | Pro | Ser |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 45 |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Leu | Ala | Lys | Phe | Leu | Arg | Glu | Asn | Gly | Tyr | Lys | Val | Leu | Gln | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 50 |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 55 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 60 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Ser | Leu | Pro | Glu | Asn | Glu | Glu | Tyr | Glu | Thr | Asp | Gln | Ile | Leu | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 65 |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 70 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 75 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 80 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Leu | Ala | Trp | Met | Arg | Gln | Ile | Glu | Gly | Ala | Val | Leu | Lys | Pro | Thr |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 85 |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 90 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 95 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Leu | Pro | Ile | Gly | Asp | Gln | Glu | Tyr | Phe | Pro | Lys | Tyr | Tyr | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 100 |
| 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 105 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 110 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | His | Arg | Pro | Ser | Lys | Glu | Lys | Pro | Asn | Ala | Tyr | Pro | Pro | Asp | Ile |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 115 |
| 115 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 120 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 125 |

11

Ala Leu Leu Lys Gln Met Ile Tyr Leu Phe Leu Gln Val Pro Glu Ala
 130 135 140

Asn Glu Gly Leu Lys Asp Glu Val Thr Leu Leu Thr Gln Asn Ile Arg
 145 150 155 160

Asp Lys Ala Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Met Gly Gln Ala Asn Arg Leu
 165 170 175

Val Ala Met Lys Glu Val Ala Thr Gly Arg Asn Pro Asn Lys Asp Pro
 180 185 190

Leu Lys Leu Gly Tyr Thr Phe Glu Ser Ile Ala Gln Leu Leu Asp Ile
 195 200 205

Thr Leu Pro Val Gly Pro Pro Gly Glu Asp Asp Lys Pro Trp Val Pro
 210 215 220

Leu Thr Arg Val Pro Ser Arg Met Leu Val Leu Thr Gly Asp Val Asp
 225 230 235 240

Gly Asp Phe Glu Val Glu Asp Tyr Leu Pro Lys Ile Asn Leu Lys Ser
 245 250 255

Ser Ser Gly Leu Pro Tyr Val Gly Arg Thr Lys Gly Glu Thr Ile Gly
 260 265 270

Glu Met Ile Ala Ile Ser Asn Gln Phe Leu Arg Glu Leu Ser Thr Leu
 275 280 285

Leu Lys Gln Gly Ala Gly Thr Lys Gly Ser Asn Lys Lys Lys Leu Leu
 290 295 300

Ser Met Leu Ser Asp Tyr Trp Tyr Leu Ser Cys Gly Leu Leu Phe Pro
 305 310 315 320

Lys Ala Glu Arg Tyr Asp Lys Ser Thr Trp Leu Thr Lys Thr Arg Asn
 325 330 335

Ile Trp Ser Ala Pro Ser Pro Thr His Leu Met Ile Ser Met Ile Thr
 340 345 350

Trp Pro Val Met Ser Asn Ser Pro Asn Asn Val Leu Asn Ile Glu Gly
 355 360 365

Cys Pro Ser Leu Tyr Lys Phe Asn Pro Phe Arg Gly Gly Leu Asn Arg
 370 375 380

Ile Val Glu Trp Ile Leu Ala Pro Glu Glu Pro Lys Ala Leu Val Tyr
 385 390 395 400

Ala Asp Asn Ile Tyr Ile Val His Ser Asn Thr Trp Tyr Ser Ile Asp
 405 410 415

Leu Glu Lys Gly Glu Ala Asn Cys Thr Arg Gln His Met Gln Ala Ala
 420 425 430

Met Tyr Tyr Ile Leu Thr Arg Gly Trp Ser Asp Asn Gly Asp Pro Met
 435 440 445

12

Phe Asn Gln Thr Trp Ala Thr Phe Ala Met Asn Ile Ala Pro Ala Leu
 450 455 460

Val Val Asp Ser Ser Cys Leu Ile Met Asn Leu Gln Ile Lys Thr Tyr
 465 470 475 480

Gly Gln Gly Ser Gly Asn Ala Ala Thr Phe Ile Asn Asn His Leu Leu
 485 490 495

Ser Thr Leu Val Leu Asp Gln Trp Asn Leu Met Arg Gln Pro Arg Pro
 500 505 510

Asp Ser Glu Glu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Lys Leu Gly Ile Asn Phe
 515 520 525

Lys Ile Glu Arg Ser Ile Asp Asp Ile Arg Gly Lys Leu Arg Gln Leu
 530 535 540

Val Leu Leu Ala Gln Pro Gly Tyr Leu Ser Gly Gly Val Glu Pro Glu
 545 550 555 560

Gln Ser Ser Pro Thr Val Glu Leu Asp Leu Leu Gly Trp Ser Ala Thr
 565 570 575

Tyr Ser Lys Asp Leu Gly Ile Tyr Val Pro Val Leu Asp Lys Glu Arg
 580 585 590

Leu Phe Cys Ser Ala Ala Tyr Pro Lys Gly Val Glu Asn Lys Ser Leu
 595 600 605

Lys Ser Lys Val Gly Ile Glu Gln Ala Tyr Lys Val Val Arg Tyr Glu
 610 615 620

Ala Leu Arg Leu Val Gly Gly Trp Asn Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Ala
 625 630 635 640

Cys Lys Asn Asn Ala Gly Ala Ala Arg Arg His Leu Glu Ala Lys Gly
 645 650 655

Phe Pro Leu Asp Glu Phe Leu Ala Glu Trp Ser Glu Leu Ser Glu Phe
 660 665 670

Gly Glu Ala Phe Glu Gly Phe Asn Ile Lys Leu Thr Val Thr Ser Glu
 675 680 685

Ser Leu Ala Glu Leu Asn Lys Pro Val Pro Pro Lys Pro Pro Asn Val
 690 695 700

Asn Arg Pro Val Asn Thr Gly Gly Leu Lys Ala Val Ser Asn Ala Leu
 705 710 715 720

Lys Thr Gly Arg Tyr Arg Asn Glu Ala Gly Leu Ser Gly Leu Val Leu
 725 730 735

Leu Ala Thr Ala Arg Ser Arg Leu Gln Asp Ala Val Lys Ala Lys Ala
 740 745 750

Glu Ala Glu Lys Leu His Lys Ser Lys Pro Asp Asp Pro Asp Ala Asp
 755 760 765

13

Trp Phe Glu Arg Ser Glu Thr Leu Ser Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asp
 770 775 780

Ile Ala Ser Lys Val Ala His Ser Ala Leu Val Glu Thr Ser Asp Ala
 785 790 795 800

Leu Glu Ala Val Gln Ser Thr Ser Val Tyr Thr Pro Lys Tyr Pro Glu
 805 810 815

Val Lys Asn Pro Gln Thr Ala Ser Asn Pro Val Val Gly Leu His Leu
 820 825 830

Pro Ala Lys Arg Ala Thr Gly Val Gln Ala Ala Leu Leu Gly Ala Gly
 835 840 845

Thr Ser Arg Pro Met Gly Met Glu Ala Pro Thr Arg Ser Lys Asn Ala
 850 855 860

Val Lys Met Ala Lys Arg Arg Gln Arg Gln Lys Glu Ser Arg Gln
 865 870 875

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV)

<400> 3

Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu Glu
 1 5 10

<210> 4

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 5' utilizado para la generación de los distintos mutantes de delección del extremo carboxi terminal de His-VP3 en combinación con las SEQ. ID. NO: 5, SEQ. ID. NO: 6, SEQ. ID. NO: 7, SEQ. ID. NO: 8 y SEQ. ID. NO: 9, respectivamente

<400> 4

gggggaattc atggcatcag agttcaaaga gacccccc 37

<210> 5

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ248-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 5

cgcgggtacc ttaccagcgg cccagccgac c 31

14

<210> 6
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ243-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 6
cgcggttacc ttaaccaggg ggtctctgtg ttg 33

<210> 7
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ238-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 7
cgcggttacc ttatgttga gcattgggtt ttg 33

<210> 8
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ233-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 8
cgcggttacc ttatttggc ttgggcttg g 31

<210> 9
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ228-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 9
cgcggttacc ttatggtaga gccccctgg g 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N7/04, 15/866, A61K39/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------------------|
| X | LOMBARDO, E., MARAVER, A., CASTÓN, J. R. et al. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. Journal of Virology . August 1999, Vol 73, N° 8, pages 6973-6983. | 1, 2, 8, 13-15, 17, 19-22, 26, 27 |
| Y | FR 2824327 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA-FR.) 08.11.2002. pages 1-3; page 7, line 19 - page 13. | 3-7, 9-12, 16, 18, 23-25, 28-38 |
| | | 3-7, 9-12, 16, 18, 23-25, 28-38 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 JUL 2004 (22.07.04)

Date of mailing of the international search report

02 AUG 2004 (02.08.04)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000147

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | TACKEN, M. G. J., ROTTIER, P. J. M., GIELKENS, A. L. J. PEETERS, B. P. H. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. <i>Journal of General Virology</i> . 2000, Vol 81, pages 209-218. | 1-10, 18, 19, 35 |
| A | MARAVER, A., CLEMENTE, R., RODRÍGUEZ, J. F., LOMBARDO, E. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. <i>Journal of Virology</i> . Feb. 2003, Vol 77, Nº4, pages 2459-2468. | 1-10, 18, 19, 35 |
| A | KATAGIRI, Y., INGHAM, K. C. Enhanced production of green fluorescence fusion proteins in baculovirus expresion system by addition of secretion signal. <i>Biotechniques</i> . July 2002, Vol 33, pages 24-26. | 7, 24, 25, 35-38 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/000147

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| FR 2824327 A1, B | 08.11.2002 | WO 2002088339 A2 AU 2002310654 | 07.11.2002 11.11.2002 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/ ES 2004/000147

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (Continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a) Tipo de material
 - una lista de secuencias
 - Tabla(s) relativas a la lista de secuencias
 - b) Formato del material
 - por escrito
 - en soporte legible por ordenador
 - c) Fecha de presentación/entrega
 - contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
 - presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000147

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N7/04, 15/866, A61K39/12

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|--|--|
| X | LOMBARDO, E., MARAVER, A., CASTÓN, J. R. et al. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. Journal of Virology. Agosto 1999, Vol 73, Nº 8, páginas 6973-6983. | 1, 2, 8, 13-15, 17, 19-22, 26, 27 |
| Y | FR 2824327 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA-FR.) 08.11.2002. Páginas 1-3; página 7, línea 19 - página 13. | 3-7, 9-12, 16, 18, 23-25, 28-38 |
| Y | | 3-7, 9-12, 16, 18, 23-25, 28-38 |

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

| | | |
|--|-----|--|
| * Categorías especiales de documentos citados: | "T" | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. | | |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. | | |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "X" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. | "Y" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. | "&" | documento que forma parte de la misma familia de patentes. |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

22.Julio.2004 (22.07.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

02 AGO 2004 02.08.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 3493047

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/000147

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|--|--|
| A | TACKEN, M. G. J., ROTTIER, P. J. M., GIELKENS, A. L. J. PEETERS, B. P. H. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. <i>Journal of General Virology</i> . 2000, Vol 81, páginas 209-218. | 1-10, 18, 19, 35 |
| A | MARAVER, A., CLEMENTE, R., RODRÍGUEZ, J. F., LOMBARDO, E. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. <i>Journal of Virology</i> . Febrero 2003, Vol 77, Nº4, páginas 2459-2468. | 1-10, 18, 19, 35 |
| A | KATAGIRI, Y., INGHAM, K. C. Enhanced production of green fluorescence fusion proteins in baculovirus expresion system by addition of secretion signal. <i>Biotechniques</i> . Julio 2002, Vol 33, páginas 24-26. | 7, 24, 25, 35-38 |

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000147

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de publicación |
|---|----------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| FR 2824327 A1, B | 08.11.2002 | WO 2002088339 A2 AU 2002310654 | 07.11.2002 11.11.2002 |

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2004/000147

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (Continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a) Tipo de material
 - una lista de secuencias
 - Tabla(s) relativas a la lista de secuencias
 - b) Formato del material
 - por escrito
 - en soporte legible por ordenador
 - c) Fecha de presentación/entrega
 - contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
 - presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales: